جمهورية العراق
وزارة العليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى
كلية التربية للعلوم الصرفة

دراسة بكتريولوجية لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من مصادر سريرية مختلفة في مدينة بعقوبة وضواحيها .

رسالة مقدمة الى

كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة – الأحياء المجهرية

من قبل

لينا عبدالأمير سلمان السعدي

بكالوريوس علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة ديالى ٢٠٠٤ – ٢٠٠٥

بإشراف

أ.د. عدنان نعمة عبدالرضا العزاوي **أ.م.د. هادي رحمن رشيد الطائي**

محرَم/١٤٣٣هـ **كانون الأول/٢٠١١ م**

فهرست المحتويات

التسلسل	الموضوع	الصفحة
	الفصل الاول : المقدمة	
١	**المقدمة**	١
	الفصل الثاني : أستعراض المراجع	
٢	استعراض المراجع	3
١.٢	بكتريا الزوائف الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa*	3
٢.٢	الزوائف الزنجارية وبائية بكتريا Epidemiology of *P .aeruginosa*	4
٣.٢	الأمراض المتسببة عن بكتريا الزوائف الزنجارية	5
2.3.1	الإصابات الجلدية Skin Infections	5
2.3.2	إصابات المجاري البولية Urinary Tract Infections	6
2.3.3	إصابات الاذن Ear Infections	6
2.3.4	الأمراض الأخرى المتسببة عن بكتريا الزوائف الزنجارية	6
2.4	عوامل الضراوة في بكتريا الزوائف الزنجارية	7

8	عوامل الإلتصاق والأستيطانAdhesion & Colonization Factors	2.4١٠
8	أنزيم الليسيثينيزLecithinase Enzyme	4.2٢٠
9	إنتاج الهيمولايسينHemolysin Production	3.4.2
9	انزيم البروتييزProtease Enzyme	4.4.2
10	انزيم اليورييزurease Enzyme	5.4.2
11	المضادات الحيويةAntibiotics	5.2
11	مضادات البيتالاكتامβ-Lactam Antibiotic	1.5.2
12	البنسلينات Penicillins	1.1.5.2
12	البنسلينات محددة الطيف Narrow Spectrum Penicillins	1.1.1.5.2
12	البنسلينات الطبيعيةNatural Penicillins	1.1.1.1.5.2
12	البنسلينات ضد المكورات العنقوديةAnti Staphylococcal Penicillins	2.1.1.1.5.2
13	بنسلينات واسعة الطيف Broad spectrum Penicillins	2.1.1.5.2
13	البنسلينات ضد الزوائفAnti Pseudomonal Penicillins	3.1.1.5.2
13	مجموعة كاربوكسي بنسلينCarboxy Penicillins	1.3.1.1.5.2
13	مجموعة اليوريدوبنسلينUreido Penicillins	2.3.1.1.5.2
14	السيفالوسبورينات Cephalosporins	2.1.5.2

14	First generation cephalosporinsسيفالوسبورينات الجيل الاول	**1.2.1.5.2**
15	Second generation cephalosporinesسيفالوسبورينات الجيل الثاني	**2.2.1.5.2**
15	Third generation cephalosporinsسيفالوسبورينات الجيل الثالث	**3.2.1.5.2**
15	Fourth generation cepalosorinesسيفالوسبورينات الجيل الرابع	**4.2.1.5.2**
16	Fifth generation cephalosporinsسيفالوسبورينات الجيل الخامس	**5.2.1.5.2**
16	Carbapenems الكربابنيم	**3.1.5.2**
16	Monobactamالمونوباكتام	**4.1.5.2**
17	Carbacephemsالكارباسفيم	**5.1.5.2**
17	Aminoglycosidesالامينوكلايكوسيدات	**2.5.2**
18	Quinolonesالكوينولونات	**3.5.2**
18	Sulfonamides & Trimethoprimeالسلفوناميد والتراي مثيريم	**4.5.2**
18	Nitrofurantoinالنيتروفيورانتوين	**5.5.2**
19	*P.aeruginosa* Antibiotic Resistanceمقاومة الزوائف الزنجارية للمضادات الحيوية	**6.2**
20	إنتاج أنزيمات محللة لبعض انواع مضادات الحياة	**1.6.2**
20	Modification of antibiotic targetتحوير الموقع الهدف لعمل المضاد	**2.6.2**
21	Alteration in Permeablity barrierالتحوير في حاجز النفاذية	**3.6.2**

21	مضخات الدفقDrug Efflux Pumps	4.6.2
22	زيادة إنتاج المواد التنافسية Increase Production Of Competitive Compounds	5.6.2
23	الطبقة المخاطيةSlime layer	6.6.2
23	أنزيمات البيتالاكتاميزβ -Lactamase Enzyme	7.2
23	آلية عمل أنزيم البيتالاكتاميزThe Mechanism of β-Lactamase Action	1.7.2
24	تصنيف أنزيمات البيتالاكتاميزClassification of β -Lactamase	2.7.2
25	العوامل الوراثية المسيطرة على أنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز	4.7.2
25	أنزيمات البيتالاكتاميز الكروموسوميةChromosomal β -Lactamase	1.4.7.2
26	أنزيمات البيتالاكتاميز البلازميديةPlasmid-mediated –β-Lactamase	2.4.7.2
26	أنزيمات البيتالاكتاميز التي تتواسطها جينات قافزة	3.4.7.2
27	أنزيمات البيتالاكتاميز التي تتواسطها الأنتجرونات	4.4.7.2
27	أنزيمات البتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs	5.7.2
29	مثبطات البيتالاكتاميزβ-Lactamase Inhibitors	8.2
29	مثبط حامض الكلافيولنكClavulanic acid	1.8.2
30	السلباكتامSulbactam	2.8.2
30	التازوباكتمTazobactam	3.8.2
31	النسق البلازميدي لبكتريا الزوائف الزنجارية	9.2

10.2	Plasmids curingتحييد البلازميدات	32
الفصل الثالث : المواد وطرائق العمل		
١.٣	الأجهزة والمواد المستعملة	33
١.١.٣	الأجهزة المستعملة	33
٢.١.٣	المواد الكيمياوية والبايلوجية	34
٣.١.٣	الأوساط الزرعية	35
4.1.3	الكواشف والمحاليل	35
٥.١.٣	المضادات الحيوية	36
1.5.1.3	اقراص المضادات الحيوية المستخدمة واقطار منطقة التثبيط القياسية	36
2.5.1.3	مساحيق المضادات الحيوية	37
6.1.3	Inhibitorsالمثبطات	37
7.1.3	السلالات القياسية	38
8.1.3	مواد متفرقة	38
1.8.1.3	عدة التشخيص api 20NE Kit	38
2.8.1.3	عدة عزل الدنا البلازميدي Plasmid Extraction	38
3.8.1.3	مصدر الدم	38

٢.٣	طرائق العمل	39
٢.٣١.	تحضير المحاليل والكواشف	39
٢.٣.١.١	المحلول الملحي الفسلجي Normal Saline	39
٢.١ ٢.٣.	محلول ثابت العكورة القياسي Macfarland Standard	39
٢.٣١.٣.	محاليل المضادات الحيوية	39
٢.٣١.٤.	محاليل الكشف عن أنزيم البيتالاكتاميز	40
1.4.1.2.3	محلول النشأ Starch Solution	40
2.4.1.2.3	محلول اليود Iodine Solution	40
3.4.1.2.3	محلول البنسلين جي (Penicillin G Solution)	40
٥.١.٢.٣	محاليل عزل الدنا البلازميدي	41
6.1.2.3	محاليل الترحيل الكهربائي Gel Electrophoresis Solutions	41
7.1.2.3	كاشف أنزيم الكاتاليز Catalase Reagent	41
8.1.2.3	كاشف الاوكسيديز Oxidase Reagent	42
2.2.3	الاوساط الزرعية	42
1.2.2.3	وسط أكار الدم Blood base agar	42
2.2.2.3	وسط مرق لوريا Lauria Broth	43

3.2.2.3	وسط أكار اليوريا Urea base Agar	**43**
4.2.2.3	وسط ماء الببتون Pepton water	**43**
5.2.2.3	وسط المثيل الاحمر – فوكس بروسكاور السائل MR-VP Broth	**43**
6.2.2.3	وسط أكار السيدوموناس *Pseudomonas* isolation agar	**44**
7.2.2.3	وسط أكار الحليب الخالي من الدهن skim milk Agar media	**44**
8.2.2.3	وسط أكار البيض Egg Yolk agar	**44**
3.2.3	جمع العينات	**44**
4.2.3	زرع العينات Samples culture	**45**
5.2.3	حفظ وإدامة العزلات البكتيرية	**45**
6.2.3	تشخيص العزلات البكتيرية	**45**
1.6.2.3	الفحوصات المورفولوجية	**45**
2.6.2.3	الفحوصات الكيموحيوية	**45**
1.2.6.2.3	إختبار أنزيم الكاتاليز Catalase test	**45**
2.2.6.2.3	إختبار أنزيم الاوكسيديز Oxidase test	**46**
3.2.6.2.3	إختبار الاندول Indole test	**46**
4.2.6.2.3	إختبار احمر المثيل Methyl red test	**46**

46	اختبار فوكس بروسكاورVoges –Proskaur test	**5.2.6.2.3**
47	إختبار استهلاك السترات Citrate Utilization test	**6.2.6.2.3**
47	التشخيص بنظامApi-20NE	**3.6.2.3**
48	التحري عن بعض عوامل الضراوة في بكتريا الزوائف الزنجارية	**7.2.3**
48	التحري عن أنزيم الليسيثينيزLecithenase Production test	**1.7.2.3**
48	التحري عن إنتاج الهيمولايسينHaemolysin Production	**2.7.2.3**
48	التحري عن أنزيم البروتييزProtease Production test	**3.7.2.3**
48	اختبار قابلية العزلات على الالتصاق بالخلايا الطلائية	**4.7.2.3**
48	تحضير الخلايا الطلائية	**1.4.7.2.3**
49	إختبار الالتصاق بالخلايا الطلائية الظهارية	**2.4.7.2.3**
49	اختبار تلازن كريات الدم الحمرtest Hemagglutination	**5.7.2.3**
49	تحضير كريات الدم الحمر للانسان	**1.5.7.2.3**
49	اختبار تلازن كريات الدم الحمر	**2.5.7.2.3**
50	التحري عن أنزيم اليوريزUrease test	**6.7.2.3**
50	فحص الحساسية لمضادات الحياة Antibiotic suscepitibility test	**8.2.3**
50	التحري عن إنتاج أنزيم البيتالاكتاميزβ-Lactamase Production	**9.2.3**

1.9.2.3	الفحص الاولي الخاص بانتقاء العزلات المقاومة لمضادات البيتالاكتام	50
1.1.9.2.3	تحضير العالق البكتيري	51
2.1.9.2.3	تلقيح الاوساط الزرعية	51
2.9.2.3	إستخدام طريقة اليود القياسية السريعة للكشف عن أنزيم البيتالاكتاميز	51
10.2.3	التحري عن أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف (ESBLs)	52
11.2.3	قياس التركيز المثبط الادنى Minimal Inhibitory Concentration	52
1.11.2.3	قياس التركيز المثبط الادنى بدون مثبطات أنزيمات البيتالاكتاميز	52
2.11.2.3	قياس التركيز المثبط الادنى مع مثبطات أنزيمات البيتالاكتاميز	53
12.2.3	إستخلاص الدنا البلازميدي DNA Extraction Plasmid	54
13.2.3	الترحيل الكهربائي للدنا البلازميدي في هلام الاكاروز Gel Electrophoresis	55
14.2.3	تحييد الدنا البلازميدي Curing of Plasmid DNA	55
15.2.3	التحليل الإحصائي	56
الفصل الرابع : النتائج والمناقشة		
4	النتائج والمناقشة	57
١.٤	عزل وتشخيص بكتريا الزوائف الزنجارية	57
١.١.٤	العزل Isolation	57

٢.١.٤	Identificationالتشخيص	57
3.1.4	توزيع العزلات حسب موضع الاصابة	59
٢.٤	الزوائف الزنجارية التحري عن بعض عوامل الضراوة المهمة لبكتريا	61
1.2.4	Lecithinase Productionإنتاج انزيم الليسيثينيز	62
2.2.4	Hemolysin Production إنتاج الهيمولايسين	62
3.2.4	Production Protease انتاج انزيم البروتييز	62
4.2.4	اختبار قابلية العزلات على الالتصاق بالخلايا الطلائية	63
5.2.4	Slid hemagglutination testاختبار التلازن الدموي	64
6.2.4	Urease Production انتاج انزيم اليورييز	65
٣.٤	حساسية بكتريا الزوائف الزنجارية للمضادات الحيوية	68
٤.٤	المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية	71
٥.٤	للمضادات الحيوية*P.aeruginosa* النسق السائد للمقاومة المتعددة لبكتريا	73
٦.٤	الانتقاء الاولي للعزلات المقاومة لمضاد الامبسلين	74
٧.٤	التحري عن أنتاج أنزيم البيتالاكتاميز	74
٨.٤	التحري عن انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف	78
٩.٤	تحديد التراكيز المثبطة الدنيا لعدد من المضادات الحيوية	80
1.9.4	بدون وجود المثبطات	80
2.9.4	تحديد التراكيز المثبطة الدنيا بوجود مثبطات انزيمات البيتالاكتاميز	84

1.2.9.4	Ampicillun/Sulbactam السلباكتام/ الامبسلين	85
2.2.9.4	Amoxicillin/Clavulanic acid حامض الكلافيولنك/الأموكزاسلين	86
3.2.9.4	Carbencillin/Clavulanic acid حامض الكلافيولنك/الكاربنسلين	87
4.2.9.4	Cephalexin/Clavulanic acid حامض الكلافيولنك/السيفالكسين	88
5.2.9.4	Cefotaxim/Clavulanic acid حامض الكلافيولنك/السيفوتاكسيم	89
6.2.9.4	Ceftriaxon/Clavulanic acid الكلافيولنك/السيفترياكسون حامض	90
7.2.9.4	Ceftazidim/Clavulanic acid حامض الكلافيولنك/السيفتازديم	91
8.2.9.4	Pipracillin/Clavulanic acid حامض الكلافيولنك/الببراسلين	93
9.2.9.4	Pipracillin/Tazobactamالتازوباكتام / الببراسلين	94
١٠.٤	النسق البلازميدي لبكتريا الزوائف الزنجارية	95
11.4	Plasmids curingتحييد البلازميدات	97
الاستنتاجات والتوصيات		
الاستنتاجات		99
التوصيات		101
المصادر		
المصادر العربية		102
المصادر الاجنبية		103

قائمة الأشكال

التسلسل	العنوان	الصفحة
1.4	نتيجة تشخيص بكتريا *P.aeruginosa* بنظام api 20 NE	58
2.4	الخلايا الطلائية كسيطرة سالبة تحت العدسة الزيتية (١٠٠)X	63
3.4	نتيجة اختبار موجبة لألتصاق بكتريا *P.aeruginosa* بالخلايا الطلائية الظهارية	64
4.4	كريات الدم الحمراء الطبيعية (40X) تحت القوى Controle	64
5.4	نتيجة أختبارموجبة لتلزين كريات الدم الحمراء تحت القوى 40X	65
6.4	النسب المئوية لمقاومة بكتريا الزوائف الزنجارية للمضادات الحيوية المختلفة	70
7.4	فحص التحري عن أنتاج أنزيم البيتالاكتاميز	75
8.4	النسبة المئوية للعزلات المنتجة وغير المنتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز	76
9.4	النسبة المئوية للعزلات المنتجة وغير المنتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف	79
10.4	أنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف للعزلة المحلية *P.aeruginosa*	79
11.4	التأثير التآزري لمضاد الأموكزاسلين و حامض الكلافيولنك ضد عزلات بكتريا	86

	Pseudomonas aeruginosa	
88	التأثير التآزري لمضاد الكاربنسلين و حامض الكلافيولنك ضد عزلات بكتريا*Pseudomonas aeruginosa*	**12.4**
89	التأثير التآزري لمضاد السيفالكسين و حامض الكلافيولنك ضد عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*	**13.4**
90	التأثير التآزري لمضاد السيفوتاكسيم و حامض الكلافيولنك ضد عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*	**14.4**
91	التأثير التآزري لمضاد السيفترياكسون وحامض الكلافيولنك ضد عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*	**15.4**
92	التأثير التآزري لمضاد السيفتازديم وحامض الكلافيولنك ضد عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*	**16.4**
93	التأثير التآزري لمضاد الببراسلين وحامض الكلافيولنك ضد عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*	**17.4**
94	التأثير التآزري لمضاد الببراسلين والتازوباكتام ضد عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*	**18.4**
96	المحتوى البلازميدي لبعض عزلات بكتريا *P.aeruginosa*	**19.4**
98	فقدان الحزم البلازميدية لعزلات المحيدة*P.aeruginosa*	**20.4**

قائمة الجداول

التسلسل	العنوان	الصفحة
1.4	الأختبارات الكيموحيوية والزرعية لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa*	59
2.4	مصدر عزل جراثيم الزوائف الزنجارية من الحالات المرضية المختلفة مع النسب المئوية للأصابة	٦٠
3.4	على إنتاج بعض عوامل *Pseudomonas aeruginosa* قابلية عزلات الضراوة	٦٦
4.4	المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية التي اظهرتها عزلات بكتريا *P.aeruginosa*	٧٢
5.4	تقسيم العزلات المحلية لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* الى مجموعتين على اساس عدد المضادات التي تقاومها	73
6.4	النسق السائد للمقاومة المتعددة للمضادات الحيوية ضمن المجموعة	74
7.4	على إنتاج *P. aeruginosa* قابلية العزلات المحلية لبكتريا أنزيم البيتالاكتاميز β- Lactamase	77
8.4	المعزولة محليا"على انتاج *Pseudomonas aeruginosa* قابلية عزلات أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف Extended – spectrum β – luctamase	80
9.4	قيم M. I .C لبعض المضادات الحيوية المستخدمة Drug of Choice في علاج الألتهابات المتسببة عن بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*	83
10.4	النسب المئوية للتأثير الخلطي لمثبطات البيتالاكتاميز / المضاد على للمضادات الحيوية *Pseudomonas aeruginosa* حساسية عزلات بكتريا	85
11.4	يوضح القيمة التائية بين Amoxicillin/Clavulanicacid و Amoxicillin عند مستوى الدلالة ٥٪ ، ١٪.	87
12.4	يوضح القيمة التائية بين Carbencillin و	88

	عند مستوى الدلالة ٥٪ ، ١٪Clavulanic acid/ Carbencillin	
13.4	وCephalexinيوضح القيمة التائية بين عند مستوى الدلالة ٥٪ ، ١٪Clavulanic acid/ Cephalexin	**89**
14.4	وCefotaximeيوضح القيمة التائية بين عند مستوى الدلالة ٥٪ ، ١٪Clavulanic acid/ Cefotaxime	**90**
15.4	وCeftriaxoneيوضح القيمة التائية بين عند مستوى الدلالة ٥٪ ، ١٪Clavulanic acid/ Ceftriaxone	**91**
16.4	Ceftazidimeيوضح القيمة التائية بين عند مستوى الدلالة ٥٪ ، ١٪Clavulanic acid/ Ceftazidime و	**92**
17.4	Clavulanic acid/Pipracillin وPipracillinيوضح القيمة التائية بين عند مستوى الدلالة ٥٪ ، ١٪	**93**
18.4	Tazobactam/ Pipracillin وPipracillinيوضح القيمة التائية بين عند مستوى الدلالة ٥٪ ، ١٪	**95**
19.4	المعزولة من أخماج مختلفة*P.aeruginosa*المحتوى البلازميدي لبكتريا	**97**

قائمة الملاحق

التسلسل	العنوان
١	إستمارة المعلومات الخاصة بالمرضى
٢	نتائج تشخيص بكتريا *P.aeruginosa* بنظام Api 20NE

3	مقاومة عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* للمضادات الحيوية المختلفة.
4	يبين التأثير الخلطي لمثبط Clavulanic acid + Amoxicillin وبنسبة (١ : ٢) (Augmentin)
٥	يبين التأثير الخلطي لمثبط Clavulanic acid + Cephalexin وبنسبة (١:٤)
6	يبين التأثير الخلطي لمثبط Clavulanic acid + Carbencillin وبنسبة (١:٤)
٧	يبين التأثير الخلطي لمثبط Clavulanic acid + Cefotaxime وبنسبة (١:٤)
٨	يبين التأثير الخلطي لمثبط Clavulanic acid + Ceftriaxone وبنسبة (١:٤)
٩	يبين التأثير الخلطي لمثبط Clavulanic acid + Ceftazidime وبنسبة (١:٤)
١٠	يبين التأثير الخلطي لمثبط Clavulanic acid + Piperacillin وبنسبة (١:٤)
١١	يبين التأثير الخلطي لمثبط Tazobactam + Piperacillin وبنسبة (١:٨)
١٢	التحليل الأحصائي بأستخدام برنامج SPSS

١-المقدمة Introduction

تعد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من الأجناس البكتيرية المهمة لكونها واسعة الإنتشار في الطبيعة و إمراضيتها العالية للإنسان والحيوان والنبات ، لهذه البكتريا القدرة على

العيش في بيئات متنوعة فهي حرة المعيشة ، تعيش في التربة والمستنقعات ومياه الأنهار وتتواجد بصورة شائعة في البيئات الرطبة للمستشفيات (Brooks *et al*., 2007) كما تسبب ما يعرف بالإصابات المكتسبة بالمستشفيات (Vianelli *et al*., 2006).

تسبب بكتريا الزوائف الزنجارية أمراضاً عديدة في جسم الإنسان منها اخماج الجروح والحروق ، واخماج العين ، واخماج الجلد ، و المجاري البولية ، و الأذن الوسطى ، وتجرثم الدم Bacteremia ، وتسبب أمراضاً عديدة عند الأشخاص الذين يعانون من أمراض نقص المناعة والأشخاص المصابين بالأيدز (Gaynes *et al*., 2005 ; Feltzer *et al*., 2003) .

إزداد الإهتمام بدراسة عوامل الضراوة لهذه البكتريا ذات العلاقة المباشرة أوغير المباشرة بالإمراضية ، إذ تمتلك بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* العديد من عوامل الضراوة التي تمكنها من تحطيم الأنسجة وإجتياح مجرى الدم ومن أهم هذه العوامل أنزيم الهيمولايسين المحلل للدم ، و اللسيثينيز ، و البروتييز ، و اليوريز ، وتلزين كريات الدم الحمر ، والقدرة على الإلتصاق بالخلايا الطلائية الظهارية (Todar , 2008 ; Choi *et al*., 2002).

تظهر صعوبة علاج هذه البكتريا بسبب مقاومتها للعديد من المضادات الحيوية ، إذ إنها مقاومة لمضادات البيتالاكتام فضلاً عن مقاومتها العالية لمضادات Fluoroquinolones و Aminoglycosides مما يجعلها من أخطر الممرضات وأكثرها إصابةً للانسان (Landman *et al*., 2002) ، ويعود سبب ذلك الى إمتلاك هذه البكتريا آليات مختلفة لمقاومة المضادات الحيوية مثل تغيير حاجز النفاذية أوتغيير في موقع الهدف أو إنتاجها للأنزيمات المحللة للمضادات الحيوية مثل أنزيمات البيتالاكتاميز(β-Lactamases) (Laura *et al*., 2002).

أشارت العديد من الدراسات حول صفات أنزيمات البيتالاكتاميز وأنواعها وإنتاجيتها الى إن هذه الأنزيمات هي السبب الرئيس في إفشال الكثير من العلاجات المستخدمة في علاج الاخماج سيما بين المرضى الراقدين في المستشفيات (Chanal *et al*., 2000) ، إن إنتاج هذه الأنزيمات يعود الى طبيعة العوامل الوراثية المشفرة لها والتي تكون كروموسومية فضلاً عن تواجدها على بلازميدات أقترانية مما يسهل إنتقالها بعمليتي الأقتران والتحول وربما محمولة على ترانسبوزونات أو إنتجرونات

(Nass *et al*., 2003) ، ومما يزيد في خطورة هذه الأنزيمات حصول الطفرات في الجينات المسؤولة عن تشفيرها لتحولها الى أنزيمات واسعة الطيف مقاومة لمضادات البيتالاكتام الحديثة ومنها الأجيال المتطورة للسيفالوسبورينات (Baho , 2006) .

كما إن حدوث الطفرات الوراثية في الجينات يؤدي الى حصول تطور سريع في مقاومة بكتريا الزوائف الزنجارية للمضادات الحيوية وذلك خلال مدة قصيرة من إستعمال هذه المضادات في العلاج ، ويعد هذا النوع من المقاومة خطيراً جداً وذلك بسبب تطور المقاومة إثناء العلاج وهو ما قد يسبب فشلاً في علاج إصابات هذه البكتريا ، الأمر الذي يتطلب البحث عن علاجات جديدة أو إستعمال أكثر من علاج في آن واحد للحد من مقاومة هذه البكتريا (Nass *et al*., 2003 ; Lynch , 2001) . ولندرة الدراسات التي تتناول وبائية هذه البكتريا في مدينة بعقوبة جاءت هذه الدراسة لتحقق الأهداف الآتية :

١- عزل وتشخيص بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من مرضى مصابين باخماج مختلفة من مستشفيات مدينة بعقوبة ، ثم التحري عن بعض عوامل ضراوتها .

٢- دراسة نمط المقاومة للمضادات الحيوية وتحديد نسق المقاومة السائد بين العزلات المحلية .

٣- التحري عن أنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز، وأنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف .

٤- دراسة التركيز المثبط الأدنى MIC بدون مثبطات البيتالاكتاميز .

٥- إستخدام مثبطات البيتالاكتاميز لإسترجاع فعالية المضادات الحيوية .

٦- دراسة المحتوى البلازميدي للعزلات الاكثر مقاومة وإجراء عملية طرد لبلازميدات العزلات المختارة (Curing process) .

إستعراض المراجع

7-

8-

9- ٢-١ بكتريا الزوائف الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa*

10- يعد العالم Schroter أول من إقترح تسمية *Bacterium aeruginosa* لهذه البكتريا الذي إمتدت دراستهُ عشر Gesssardعام (١٨٧٢) إذ عزلها من جروح متقيحة ، ثم جاء من القيح *P.aeruginosa*–١٨٩٢) إذ كان أول من إستطاع عزل1882سنوات منذ عام (

*Bacillus*الاخضر المزرق للجروح ، وميزها بوصفها بكتريا عصوية وأطلق عليها إلى *P.aeruginosa* ، تنتمي بكتريا *Pseudomonas Pyocyaneas*،ثم سميت *Pyocyanin* فضلاً عن *Xanthomonas*، التي تضم جنس Pseudomonadaceae عائلة *Pseudomonas*) الذي يضم ٧٦ نوعاً Macfaddin,2000 Todar,2008 ; Baho,2006;. (

11- عبارة عن عصيات سالبة لملون كرام إسطوانية ذات نهاية *P.aeruginosa* بكتريا مدورة طولها يتراوح بين (١.٥-٣.٠) مايكروميتر، وعرضها (٠.٥-٠.٨) مايكروميتر، تترتب بصورة مفردة أو أزواج او سلاسل قصيرة ، وتتحرك بسوط قطبي واحد او عدة أسواط ، غير مكونة للابواغ (Ryan&Ray,2004 وتحتوي على المحفظة (Capsule) Rezace *et al*.,2002(

12- تتميز بكتريا *P.aeruginosa*) بكونها هوائية اجبارياً Obligate aerobic) لكنها من الممكن أن تنمو في ظروف لاهوائية إذ تستطيع إستخدام النترات مستقبلاً نهائياً للالكترونات بدلاً عن الاوكسجين مما يساعدها على النمو في ظروف لا هوائية (Rabaey&verstracte , على الاوساط الزرعية الشائعة *P.aeruginosa*. تنمو بكتريا) 2005; Valls *et al*., 2004 ، ودرجة)Brooks *et al*.,2007جميعها دون الحاجة الى متطلبات غذائية معقدة (م°) وليس الحرارة المثلى للنمو (٣٧م°)، ولكنها تنمو في مدى واسع من درجات الحرارة (٥-٤٢ لها القدرة على أكسدة أو تخمير الكاربوهيدرات عدا الكلوكوز ، وتظهر هذه المستعمرات عديمة Forbes *et* اللون باهتة في وسط اكارالماكونكي لعدم تخمرها لسكر اللاكتوز المتوافر في الوسط الصبغات مثل صبغة *P.aeruginosa*) وتنتج ٩٥٪ من سلالات بكتريا (2002,. *al*) ذات اللون الاخضر المزرق وهي صفة مميزة للالتهابات القيحية ، Pyocyaninالبايوسيانين ( ) الخضراء المصفرة التي ليس لها دور في الامراضية فضلاً Fluorescinوصبغة الفلورسين ( ) . تنتج هذه البكتريا Songer,2004) (Pyorubinعن تلون بعضها باللون البني المحمر (، ولها القابلية على تحليل الدم تحللاً من)Catalase) والكاتاليز (Oxidaseأنزيم الاوكسيديز (النوع(β) Cooper *et al*.,2003; Forbes *et al*., 2002).(

13- تنتج ثلاثة أنواع من *P.aeruginosa* (٢٠٠٤) الى أن بكتريا Todarأشار المستعمرات ، النوع الاول الطبيعية المعزولة من الماء والتربة تنتج مستعمرات صغيرة وخشنة ، أما المعزولة سريرياً فتكون منتجة لنوعين من المستعمرات الاولى كبيرة وملساء وذات حافات

مستوية ومظهر مرتفع ، أما الثانية فغالباً ما تعزل من المجاري البولية والتنفسية وتكون ذات مظهر مخاطي . وفي وسط المرق المغذي تظهر بصورة عامة عكورة مع ترسبات ثقيلة .

14- تنتج بعض السلالات طبقة من الالجنيت (Alginate) وهي عبارة عن طبقة لزجة من السكريات المتعددة تشكل محفظة للبكتريا Biofilm ، يقوم بحماية البكتريا من المضادات الحيوية(بوصفه حاجزاً فيزياوياً) إذ تكون السلالات المخاطية أكثر مقاومة للمضادات الحيوية (Rezace *et al*.,2002) ، وتقوم طبقة الألجنيت بتثبيط عملية البلعمة ، إذ أن معظم السلالات المعزولة من أخماج الجهاز التنفسي السفلي ولا سيما المسببة للتليف الكيسي للرئة تكون مخاطية (Todar,2008; Baho,2006).

15-

16- الزوائف الزنجارية وبائية بكتريا ٢-٢ Epidemiology of *P .aeruginosa*

17- تستوطن بكتريا *P.aeruginosa* المستشفيات وتعد ثاني أهم المسببات للأمراض ، ويكون إنتشار هذه البكتريا في ردهات وصالات *E. coli* المكتسبة من المستشفى بعد بكتريا المستشفى الذي قد يتم عن طريق الراقدين والعاملين فيها ، إذ وجد أن معدل الاستيطان لهذه البكتريا في الانسان السليم أقل من ٦٪ بينما معدل الأستيطان في المرضى داخل المستشفى (Snoger,2004) وتدخل يكون ٣٨٪ ، أما الذين لديهم ضعف في الجهاز المناعي فانها ٧٨٪ (هذه البكتريا بيئة المستشفى عن طريق الفواكه والخضر الملوثة ، كما توجد في البيئات الرطبة والارضيات المستشفيات والحمامات والمطابخ والادوات الطبية (Baron& finegold,1990.)

18- تسبب جراثيم الزوائف الزنجارية *P. aeruginosa* امراضاً عديدة منها اخماج الجروح ، والحروق، واخماج المجاري البولية ، واخماج الاذن الوسطى المزمنة ، واخماج المجاري التنفسية السفلية ، وتسمم الدم (Kenneth,2004).

19- اعتماداً على احصائيات مركز NNIS ( ) للسيطرة المرضية والوقائية لبيانات جمعت ما بين الاعوام (١٩٩٢-١٩٩٩) فإن بكتريا *P .aeruginosa* تأتي في المرتبة الثانية من المسببات الشائعة لذات الرئة ، والمرتبة الرابعة من المسببات الشائعة لاخماج المجاري البولية، وفي المرتبة السادسة من مسببات مجرى الدم في وحدات العناية المركزة (Christopher *et al*.,2005.)

20- ٢-٣ الامراض المتسببة عن بكتريا الزوائف الزنجارية

21- Diseases Caused by *P.aeruginosa*

22- تعد بكتريا *P. aeruginosa* مسبباً مهماً للاصابات، وخصوصاً عند الأشخاص الذين يعانون من ضعف الجهاز المناعي (Brooks *et al*., 2007) ، كما ان هذه البكتريا تمثل معظم العزلات الشائعة من المرضى الذين يرقدون المستشفى لاكثر من أسبوع مثل المرضى الذين يعانون من حروق أو الراقدين في العناية التنفسية المركزة (Fiorillo *et al*.,2001 Todar , 2008 ;(.

23- ٢-٣-١ الاصابات الجلدية Skin infections

24- تحدث الاصابة بعد تحطم الجلد المغلف للجسم نتيجة لعدد من الاصابات منها الجروح، والحروق، والرضوض ،والكدمات وغيرها مما يؤدي الى تلوث هذه المناطق بالجراثيم المحيطة وهذا يؤدي الى التهاب خلايا الادمة ،وتحت الادمة، ومن ثم إنتشارها الى أنحاء الجسم المختلفة وكذلك حالات الحروق التي تؤدي الى حدوث تحطم نسيجي ونضوح بلازما الدم خارج الجلد لتصبح المنطقة منبتاً جيداً لنمو الجراثيم وتكاثرها (Brooks *et al*., 2007; اكثر تعقيداً عند انتقال البكتريا لمجرى الدم ، وحدوث تجرثم) ، وتصبح الحالة Todar,2004 (Still) إذ يصل معدل الوفيات بين المرضى المصابين بها الى ٧٥٪ (Bacteremia الدم (and Law ,2001.(

25- إنَ بكتريا الزوائف الزنجارية لا تنمو على الجلد الجاف ولكن تنمو جيداً على الجلد الرطب وتسبب قيحاً أخضراً وهذه الاصابات من الممكن ان تتطور عند الاشخاص الذين تكون ايديهم مغمورة مدة طويلة في الماء كذلك فأن الاصابات الثانوية تحدث عند الاشخاص المصابين بالاكزمة وغيرها من الامراض الجلدية (Fiorillo *et al*.,2001) كما عزلت بكتريا Wychoff من التهاب جذر الشعر وانواع صعبة العلاج من حب الشباب (*P. aeruginosa* *et al*.,2002. (

26- ٢-٣-٢ إصابات المجاري البولية Urinary tract infections

27- عادة ما تكون مكتسبة من *P. aeruginosa* اصابات المجاري البولية المتسببة عن المستشفيات إذ ترتبط بعملية القثطرة للمجاري البولية (Chatheterization) او بالعمليات الجراحية ، وتعد هذه البكتريا المسبب الثالث لاصابات المجاري البولية المكتسبة من المستشفيات كما إن بكتريا الزوائف الزنجارية ممكن ان تغزو الدم عن طريق *E.coli , Staph aureus* بعد

١٢٪ من التهابات *P .aeruginosa*) حيث تشكل Fiorillo *et al*.,2001المجاري البولية ( )Todar,2008المجاري البولية المكتسبة في المستشفيات (.

28- تشكل نسبة *P.aeruginosa*) الى أن بكتريا Muhsin , 2010 (تشير دراسة قامت بها Issa و Ali٢٢.٧٣٪ من إلتهابات المجاري البولية في الأطفال ، بينما أشار الباحثان (٢٠٠٤) إلى أن هذه البكتريا تشكل نسبة ٢٨.٨١٪ من التهابات المجاري البولية .

29- ٢-٣-٣ إصابات الاذن Ear infections

30- مسببات شائعة لبعض حالات إصابات *P .aeruginosa* بكتريا الزوائف الزنجارية الاذن الخارجية مثل التهاب أذن السباحين ، إن هذه البكتريا غالباً ما تتواجد في الاذن الطبيعية ولكن عندما تقطن القنوات السمعية الخارجية فإنها ترتبط بحدوث أضرار والتهابات في حالات مسبب شائع لالتهاب الاذن الوسطى *P.aeruginosa*وجود رطوبة بسيطة ، كذلك فان بكتريا المزمن Chronic otitis media) ; Todar , 2004 Wariso & Ibe , 2006.(

31- ٢-٣-٤ الامراض الاخرى المتسببة عن بكتريا الزوائف الزنجارية

32- Other Diseases Caused by *P. aeruginosa*

33- تسبب عدداً من الامراض *P. aeruginosa*إضافة الى ما ذكر من أمراض فإن بكتريا الاخرى إذ تصيب الجهاز الهضمي في أي جزء ابتداءاً من البلعوم وحتى المستقيم ، وايضاً الاصابة بها مرتبطة بالضعف المناعي ، ايضاً تصيب هذه البكتريا صمامات القلب عند الوريد ، كذلك ممكن أن تصيب صمامات الاشخاص الذين يتعاطون المخدرات عن طريق القلب الصناعية الموضوعة بعمليات جراحية (Todar,2004).

34- ممرضاً شائعاً للجهاز التنفسي للانسان ، وبصورة *P. aeruginosa* كما تعد بكتريا خاصة سبباً مهما في أخماج الجهاز التنفسي المزمنة المتعلقة بالتليف الكيسي) اذ ان الاصابات المزمنة للجهاز التنفسي تنتشر بين الاشخاص ذوي Cystic fiberosis( ) ، إن اصابات الجهاز التنفسي المتسببة عن بكتريا Marty *et al*.,1998التليف الكيسي (الزوائف الزنجارية تحدث عند الاشخاص ذوي الانظمة الدفاعية الضعيفة ، وتحدث اصابات ذات الرئة عند المرضى ذوي الامراض الرئوية المزمنة والمرضى الذين يتعاطون علاج السرطان)Todar,2008.(

35- إصابات مدمرة في عين الانسان ، اذ تعد واحدة من *P. aeruginosa* كما تسبب بكتريا المسببات الشائعة لالتهاب القرنية ، وخراج الغشاء الخارجي للعين عند الكبار، كما تسبب التهاب ومن الممكن ان تستعمر الطبقة الطلائية *P. aeruginosa*العين ، والرمد عند الاطفال وبكتريا

feltzer *et* للعين بوساطة الارتباط الهدبي للبكتريا بمستقبلات خلايا الطبقة الطلائية (التجرثم الدموي بعد وصول الجراثيم الى مجرى الدم وتكاثرها) ، كما يحدث2003,.*al* وانتشارها. معظم اصابات الزوائف الزنجارية تكون مكتسبة من المستشفيات وتمثل نسبة ٢٥٪ من كل المسببات السالبة لصبغة كرام المكتسبة من المستشفيات كما ان معدل الوفيات فيها) . Todar,2008بحدود ١٠٪ (

36-

37- **الزوائف الزنجارية عوامل الضراوة في بكتريا ٢- ٤**

38- ***Pseudomonas aeruginosa* virulence factors**

39- على إحداث إصابات متعددة قد يكون نتيجة *P.aeruginosa* إن قدرة بكتريا لقابليتها الكبيرة على انتاج مدى واسع من عوامل الضراوة المرتبطة بالخلية (داخل الخلوية)) ، فعلى سبيل المثال تمتلك هذه البكتريا Williams *et al*.,2000والعوامل خارج الخلوية ( )، وعديد السكريد (Flagella) ، الاسواط piliعوامل ضراوة مرتبطة بالخلية مثل الأهداب (، والالجنيت ، أما عوامل الضراوة خارج الخلوية فقد تضم السموم ذات الاوزان LPSالشحمي الجزيئية المنخفضة التي تفرزها البكتريا مثل الفينازين ، والهيمولايسين أو عوامل الضراوة متعددة Todar , والبروتييز والفوسفولايبيز و الليسيثينيز (ADPالبروتين مثل الانزيمات الناقلة لـ 2008 ; Choi *et al*.,2002 :) ومن أهم هذه العوامل

40- **١-٤-٢Adhesion and Colonization Factors عوامل الالتصاق والاستيطان**

41- إن قابلية البكتريا على الالتصاق وإستيطان الأغشية المخاطية هي أول مرحلة من مراحل بالخلايا الطلائية المبطنة للانسجة والاعضاء *P.aeruginosa*تطور الخمج . تلتصق بكتريا) الموجودة على سطح البكتريا بالتصاق بكتريا Pili، و تساهم الاهداب (المصابة ،كما إنها تلعب دوراً رئيسياً في الاستيطان البدائي لاحداث الخمج في الاغشية*P.aeruginosa* المخاطية للمسالك البولية والتناسلية والمعوية والمجرى التنفسي الخاص بالمرضى المصابين بالخلايا الطلائية *P.aeruginosa*) ، إذ ترتبط بكتريا Arora *et al*.,1998بالتليف الكيسي (للمجاري التنفسية العليا وبالخلايا الطلائية للمجاري البولية بوساطة الاهداب ، وان هذا الارتباط موجودة Sialic acid أو Mannose أو Galactoseيكون عن طريق مستقبلات خاصة لـ للمجاري التنفسية *P.aeruginosa*على أسطح الخلايا الطلائية وان عملية إستعمار بكتريا تعد الأهداب واحدة من أهم)Todar,2004;Kenneth,2004.تحتاج الى الاهداب (

عوامل الضراوة والتي هي عبارة عن خيوط سطحية مرنة تنتج عند اقطاب الخلية البكتيرية وتمتد الاهداب من الجهة الأمامية للخلية ، كما أن تماس الاهداب مع أي سطح يؤدي الى إتساع وإنكماش الاهداب الذي ينتج عنه الحركة اللولبية، وهذه الحركة تحدث بوساطة أهداب النوع الرابع التي تحتاجها للانتشار المتعاقب فوق سطح الخلية المضيفة (Kohler *et al*.,2000).

42- كذلك تساهم الجزيئات الكبيرة (Macromolecules) الموجودة في السطح الخارجي للبكتريا بعملية الالتصاق والاستيطان ، ومن أهم هذه الجزيئات هي متعدد السكريد الشحمي (Lipopolysaccharide: LPS) (Norman *et al*.,2002) .

43- ٢-٤-٢ أنزيم اللسيثينيز Lecithinase Enzyme

44- تنتج جراثيم *P.aeruginosa* انزيماً فعالاً في تكسير Lecithen الذي هو أحد مكونات الغشاء الخلوي (Cell membranes) ، وقد أتضح ان التركيب الكيميائي لهذا الانزيم هو Phospholipase إذ يحرر الفسفور والكولين من الليسيثين ، ويساعد هذا الانزيم على غزو هذه الجراثيم لانسجة الجسم (Invasivenes) Udo & Jacob,2000.)

45- وهذا الانزيم لا يحلل الليسيثين فقط بل ايضاً الفوسفات الدهنية (Phospholipids) مثل سفنجيومايلين (Sphingomylin) وفوسفاتيديل الامين الاثيلي (phosphatidy ethanolamine) والسيفالين (Cephalin) والثرمبوبلاستين (thromboplastine) (Udo & Jacob,2000.)

46- ٢-٤-3 إنتاج الهيمولايسين Haemolysin Production

47- الهيمولايسين عبارة عن أنزيم يقوم بتدمير الغشاء الخلوي لكريات الدم الحمراء Erythrocytes مما يؤدي الى تحللها محدثاً بذلك الأصابة التجرثمية Septic infection (Liaw *et al*.,2000).

48- تنتج بكتريا *P.aeruginosa* نوعين من الهيمولايسين الاول يطلق عليه Rhamnolipid hemolysin ، إذ تعمل هذه الانزيمات بصورة مشتركة على تحطيم الدهون Lipids والليسيثين Lecithin وكلاهما يسهم في غزو وتحطيم الانسجة بوساطة تأثيرهما السمي للخلايا (Todar,2004; Rhamnolipid hemolysin) . يمتلك Christopher *et al*.,2005 تركيباً مشابها لتركيب (PLC(Phospholipase C ، والاخر يطلق عليه) ويعتقد ان ذلك يعينه في إذابة الدهون المفسفرة لسطح الرئة جاعلاً المنظفات Detergents (

، مما ينجم PLC (Phospholipase C) إياها أكثر عرضة وسهولة للكسر والتحطيم بوساطة (عنه فقدان لنسيج سطح الرئة وتحطمه مؤدياً الى فقدان او تثبيط الحركة الهدبية للخلايا الطلائية في الجهاز التنفسي للانسان (Ostroff & Vasil.,1987.)

49-

50- ٢-٤-٤ أنزيم البروتييز Protease Enzyme

51- يعد البروتييز(Protease المفرز خارج الخلايا من العوامل المهمة في تدمير الانسجة اثناء الإصابات التي تسببها بكتريا *P.aeruginosa* ، وهو واحد من أهم عوامل الضراوة في مرحلة الغزو (Engle *et al*.,1998.)

52- يمتلك الانزيم وزناً جزيئياً قدره ٢٦ كيلو دالتون ونقطة التعادل الكهربائي ٨.٧ ويكون الانزيم فعالاً في مدى واسع من الأس الهيدروجيني (٦-١١)، والفعالية القصوى له في أس هيدروجيني ١٠ بدرجة حرارة ٤٥ م° (Wilderman *et al*.,2001.)

53- تنتج بكتريا *P.aeruginosa* أنواع عدة من أنزيمات البروتييز تشمل Elastase بنوعيه A,B) LasA elastase, LasB elastase) ، والبروتييز القاعدي (Alkaline) وتساهم هذه الانزيمات بزيادة ضراوة البكتريا سيما المصابين بالحروق خاصة أنزيم protease إذ يحلل الطبقة المتقرنة والكولاجين ، أما البروتييزالقاعدي فإنه يحلل الفايبرين ،Elastase الـ (Braun *et al*,2000) ، إضافة الى ذلك فإن كلا النوعين يدمران المادة الصلبة للقرنية ، وينتجان في رئات المرضى المصابين بالتليف الكيسي مما يؤدي الى دمار الخلايا الطلائية للجهاز التنفسي ويساهمان في عدم فعالية كل من انترفيرون كاما (Gamainterferon IFN-γ) وعامل التنخر (Tumor necrosis factor TNF) (Todar,2008 .)

54- أشار (Petermann) الى ان أنزيم البروتييز له قابلية على تحليل 2001 وجماعته الموجود في جدران الاوعية الدموية وانواع عديدة من الجزيئات الفعالة بايولوجياً مثل Elastin والفايبرينوجين Complement Compound ومكونات المتمم Immunoglobulin التي ترتبط بالاستجابة المناعية للانسان، ويعمل انزيم البروتييز على تحلل Fibrinogen ومن ثم يحلل Fibrin مع تشكيل الـ Protease الانسجة الرخوة ومكوناتها كما يتداخل انزيم Fibrin) Todar,2004.)

55- 2-4-٥ أنزيم اليوريز Urease Enzyme

56- تشير الدراسات الحديثة الى أهمية اليوريز لكونه مسبباً مرضياً وعامل ضراوة للعديد من أنواع البكتريا وينتج من قبل العديد من الاجناس البكتيرية المسببة لخمج المجاري البولية مثل

) إذ يلعب دوراً مهماً في *Proteus , klebsiella , Pseudomonas* (Ahmed *et al*.,2003) وكذلك في تطور (Nephrolithiasis) وتحصي الكلية (Colonizationعملية الاستعمار ( ) التهابات حويض الكلية (Dattelbaum *et al*., 2003.)

57- أظهرت الدراسات المتخصصة بالتنظيم الوراثي لمجاميع الجينات ذات العلاقة بإنتاج اليوريز بان إنتاجها يخضع لمجموعتين من الجينات تعرف الاولى بالجينات التركيبية Structural genes يعرف Transcription وهنالك جين اخر يسيطر على الاستنساخ Regulatory gene ويرمز له بالجين التنظيمي (Mulrooney & *Urer*). تمثل اليوريا المركب النايتروجيني الرئيس المطروح من جسم الانسان Husinger,2003 ، وحامض NH_3، ويعمل أنزيم اليوريز على تحليل اليوريا الى الامونيا وكذلك الحيوانات الكاربونيكH_2CO_3) Tanak *et al*.,2003. (

58- تعمل الامونيا المتحررة من تحلل اليوريا على زيادة قاعدية الادرار مما يتسبب في تقليل الفعالية البايولوجية للاجسام المضادة (Antibodies) والى تحطيم خلايا الدم البيضاء ( ). إن زيادة قاعدية الادرار يساعد في زيادة معدل تكوين Larsson ,1978 (Leukocytes) ، وإمتصاص الامونيا المتحررة من تحلل اليوريا Kaitwatcharachi *et al*.,1999الحصى ( ) مما يفعل أنزيم اليوريز يمكن ان يؤدي الى زيادة الامونيا في الدم (Hyperammonaenia)، وبما يؤدي الى وفاة المريض بسبب عجز الكلية (Van-Daele *et al*.,1998) ان البول القلوي يعزز من نمو البكتريا ومن ثم يزيد الأذية الكلوية لذا فالمعالجة تتضمن الحفاظ على درجة pH (منخفضة للبول Levinson & Jawetz,2000.)

59- ٢ المضادات الحيوية ٥-Antibiotics

60- تعرف المضادات الحيوية بإنها من النواتج الايضية الثانوية الخاصة أو المحورة والتي تمتلك فعالية ضد مجاميع مختلفة من الاحياء المجهرية ، كذلك تعرف بأنها مواد كيمياوية عضوية تنتج من قبل الاحياء المجهرية المختلفة ، ولها القدرة على تثبيط نمو الاحياء المجهرية الاخرى دون التأثير على خلايا المضيف ، وهي تشمل المنتجات المستحصلة بوساطة التحوير الكيمياوي للمضادات الطبيعية وغيرها من منتجات الايض المايكروبي او بوساطة التحوير المايكروبي للمواد المصنعة (Prescott *et al*., 2005(، كما إنها أصبحت اليوم تنتج تركيبياً) .تقسم المضادات Walled,2003على نطاق واسع لاستخدامها في علاج مختلف الاخماج ( ) ومنها الـ Broad spectrumواسعة الطيف (الحيوية من حيث طيف الفعالية الى مضادات

Narrow، والنوع الثاني مضادات محددة الطيف (Gentamicin وAmpicillin) ومن أهم مجاميع Walled,2003 (Erythromycin,Penicillin) مثل Spectrum المضادات الحيوية :

61- ٢-٥-١ مضادات البيتالاكتام β-Lactam antibiotic

62- تعد مضادات البيتالاكتام من المضادات الأكثر أهمية من بين المجاميع الدوائية المضادة للبكتيريا وأكثرها استخداماً ، وذلك لفعاليتها الواسعة ولتأثيراتها الجانبية القليلة، لذا يمكن عدها من المضادات الامينة بإستثناء المرضى الذين يعانون من الحساسية لهذه المضادات (Laurence *et al*.,1997 : وتضم مضادات البيتالاكتام المجاميع الاتية)

63-

64-

65- **٢-٥-١-١ البنسلينات Penicillins**

66- البنسلينات هي مجموعة واسعة من المضادات الحيوية الطبيعية والمضادات شبه المصنعة، ويتكون البنسلين من نواة البنسلين (6-aminopenicillinic acid) ، والضرورية للفعالية البايولوجية ، وهي عبارة عن حلقة ثايوزولدين (Thiozolidine ring) مرتبطة مع حلقة البيتالاكتام (β-lactam ring) وتتصل مع النواة سلسلة جانبية (R-side chain) يضاف لها جذور مختلفة للحصول على مشتقات للبنسلينات (المرجاني،٢٠١١) ويمكن تصنيف البنسلينات بالاعتماد على السلسلة الجانبية والفعالية ضد مايكروبية الى ما يلي (Mandell *et al*.,1995.)

67- ٢٥- ١-١-١ البنسيلينات محددة الطيف Narrow spectrum Penicillins

68- التي تضم البنسلينات الطبيعية والبنسلينات ضد المكورات العنقودية :

69- ٢٥- ١-١-١-١ البنسلينات الطبيعية Natural penicillins

70- وبنسلين في Penicillin G) Benzyl Penicillin) وتشمل كل من بنسلين جي PenicillinV) Phenyl methyl Penicillin) وهما من البنسلينات الطبيعية .

71- تمتاز هذه المجموعة بأنها فعالة ضد أغلب أنواع البكتريا الموجبة لصبغة غرام غير المنتجة لانزيمات البيتالاكتاميز فضلاً عن فعاليتها ضد البكتيريا اللاهوائية والمكورات السالبة لصبغة غرام مثل *Neisseria* (Celbrex *et al*., 2002 ; Katzung ,2001.)

72-) بمقاومته للعصارة المعدية وبثبوتيته بينما Penicillin V يمتاز بنسلين في (
) يكون حساساً للعصارة المعدية ، لذلك يعطى عن طريق العضل Penicillin G بنسلين جي (
(المرجاني ،٢٠١١).

73- **٢-١-١-١-2-5 البنسلينات ضد المكورات العنقودية**

74- **Anti staphylococcal penicillins**

75- Cloxacillin, Dieloxacillin, وتضم مجموعة من المضادات الحيوية مثل
) أول Methicillin، يعد مضاد (Katzung,2001( ) flucloxacillin, methicillin
العنقودية عام ١٩٦٠ وله فعالية مشتقات هذه المجموعة واستعمل علاجاً ضد التهابات المكورات
ضد المكورات العنقودية ، والمنتجة لانزيم البيتالاكتاميز ، وذلك لامتلاك هذا المضاد سلسلة
وتمنع من β-lactam ، والتي تحمي آصرة البيتالاكتام Acyle side –Chain اسيل جانبية
Laurence *et al*.,1997.( ) وصول الانزيم المحطم لها

76- **٢-١-١-٥-٢ بنسلينات واسعة الطيف Broad spectrum Pinicillins**

77- (الامينوبنسلين) وهي من Aminopenicillin يطلق على هذه المجموعة من المضادات
والاموكزاسلين Ampicillin المضادات شبه المصنعة وتضم كلاً من الامبسلين
Amoxycillin فضلاً عن المشتقات الجديدة Bacmpicillin ,Hetacillin, Cycloillin
تمتاز هذه المجموعة بفعالية اكبر من المجموعة السابقة إذ أن فعاليتها تشمل البكتريا العصوية
الموجبة لصبغة كرام فضلاً عن بعض الانواع السالبة لصبغة كرام بجانب فعاليتها ضد المكورات
Laurence *et al*.,1997 . ( ) السالبة لصبغة كرام المقاومة للبنسلين جي

78- **٣-١-١-٥-٢ البنسلينات ضد الزوائف Anti Pseudomonal Penicillins**

79- **١-٣-١-١-٥-٢ مجموعة كاربوكسي بنسلين Carboxy Penicillin**

80- Laurence *et* تضم هذه المجموعة مضادي Carbencillin و Ticarcillin)
al.,1997) . يمتاز هذان المضادان بفعاليتهما ضد البكتريا السالبة لصبغة كرام المقاومة
المنتجة للانزيمات المحللة وتقل فعاليتها ضد البكتريا *P.aeruginosa* للبنسلينات مثل بكتريا
Mahon&Manuselis,2000.( ) لهما

81- **٢-٣-١-١-2-5 مجموعة اليوريدوبنسلين Ureido Pencillins**

82- (Mezlocillin) ، والميزلوسلين (Azlocillin تضم هذه المجموعة مضادات الازلوسيلين (
). وهي من البنسلينات الحديثة تمتلك (Katzung, 2001) (Piperacillin، والببراسيلين (
مجاميع جانبية تسهل مرورها السريع عبر القنوات الموجودة في الغشاء الخارجي للخلية البكتيرية

)، كما ان لها الفه عالية للارتباط مع موقع الهدف في الجدار الخلوي(Mandell *et al*.,1995 ، وهي تحتوي على سلسلة جانبية مشتقة من اليوريا مرتبطة بنواة البنسلين مما يعطيها فعالية) الناتج Septicemia اذ تستعمل لمعالجة حالات التسمم الدموي (*P.aeruginosa*أعلى ضد) عنها Laurence *et al* .,1997.(

83- تمتاز هذه المضادات بحساسيتها لأنزيمات البيتالاكتاميز والمنتجة من قبل بكتريا *Klebsiella Spp, E.coli* (المرجاني ،٢٠١١) . تستخدم في علاج اخماج المجاري البولية Laurance *et al*.,1997 ، يمتاز مضاد (Piperacillin بفعاليته الواسعة ضد بكتريا الزوائف والسيلان) فهي اكثر اماناً لمرضى الكلى بسبب احتواءها على كمية قليلة من الصوديوم ( ) ، بالرغم من فعاليته ضد البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام الا أن العديد Finch,1984( ) من العزلات أصبحت مقاومة له وذلك بسبب افرازها أنزيم البيتالاكتاميز Frank *et al*.,2003.(

84-

85- ٢-١-٥-٢ السيفالوسبورينات Cephalosporins

86- تمتلك هذه المضادات فعالية واسعة الطيف أكثر من مجموعة البنسلينات ضد البكتريا العصوية السالبة لصبغة كرام والكائنات الاخرى المقاومة للبنسلينات لذا تستخدم في علاج حالات الاصابة المتكررة بالبكتريا، وتستعمل كبدائل عن البنسلينات للمرضى الذين يعانون من الحساسية من البنسلين إذ تمتاز بمقاومتها لانزيم البنسلينيز ( ) ولكن ليس Penicillinase تقسم مجموعة السيفالوسبورينات اعتماداً على تركيبها Atlas,1995( ) لانزيم السيفالوسبورنيز الكيمياوي وفاعليتها الضد مايكروبية ، كما يمكن ان تصنف الى عدة اجيال وهو المفضل لدى الكثير من الباحثين (Brooks *et al*., 2007.)

87- **١-٢-١-٥-٢ سيفالوسبورينات الجيل الاول First generation cephalosporins**

88- تضم مجموعة من المضادات التي تؤخذ فموياً (مثل Orally ، Cefactor) او بشكل زروق Injections مثل (Cefazolin , Cefaradine, Cephalexin) Brooks *et al*., 2007.(Cephapirin , Cephalothin)

89- تمتلك هذه المضادات فعالية ضد البكتريا الموجبة لصبغة كرام فضلاً عن فعاليتها ضد أفراد العائلة المعوية مثل *Klebsiella Pneumonia*، *E.coli* ، *Proteus mirabilis* ، وتكون غير فعالة *P.aeruginosa*، وتكون قليلة الفعالية ضد بكتريا (Katzung,2001)

) . وتستخدم مضادات Methicillin) Hussar,2001ضد العنقوديات المقاومة لمضاد سيفالوسبورينات الجيل الاول بصورة واسعة لعلاج الالتهابات الجلدية والمجاري البولية والتنفسية)Brooks *et al*., 2007.(

90-

91- ٢-٢-١-٥- سيفالوسبورينات الجيل الثاني2 Second generation cephalosporines

92- تضم مجموعة Cefuroxime ,Cefoxitin Cefamandol,من المضادات مثل). تمتاز بإنها اكثر مقاومة لأنزيم Tierney *et al*.,1999) ,Cefmotazole,Cefprozil) وذات فعالية جيدة ضد المكورات العنقودية وبعض البكتريا السالبة Penicillinaseالبنسلينيز ( ). يمتاز Katzung,2001) *Enterococci*لصبغة غرام ولكنها غير فعالة ضد بكتريا بوصوله بتراكيز عالية في سائل النخاع الشوكي لذا يستخدم لعلاج Cefuroximeمضاد التهاب السحايا الناجم عن بكتريا *E.coli, Klebsiella*) Christopher *et al*.,1991.(

93- ٢٥- ٣-٢-١-Third generation سيفالوسبورينات الجيل الثالث cephalosporins

94- تضم مجموعة من المضادات ومنها Ceftriaxone , Cefixime , Ceflibutien Cefoperazone and Ceftazidime , Cefotaxime)Brooks *et al*.,2007 (.

95- تمتاز هذه المجموعة بطيفها الواسع ضد أفراد العائلة المعوية المقاومة للبنسلينات). يعد Baron *et al*.,1999 والمكورات الاخرى (*Streptococcus pyogenes*وكذلك ضد اول مشتقات هذه المجموعة ويمتاز بفعاليته العالية ضد Cefotaximeمضاد السيفوتاكسيم فيمتاز بفعالية تفوق Ceftazidimeاغلب البكتريا السالبة لصبغة كرام ، أما مضاد السفتازيديم (المرجاني،٢٠١١) *P.aeruginosa* وبخاصة ضد بكتريا Cefotaximeفعالية السيفوتاكسيم Christophor *et*وبالتالي فهو يستعمل لعلاج التهابات السحايا الذي تسببه هذه البكتريا (يمتلك فعالية عالية وهو يطرح من Ceftriaxone)، أما مضاد السفترياكسون 1991,*al*.).Neu,1994الكليتين دون تغيير منتجاً تراكيز عالية منه في الادرار (

96- ٢-٥-١-٢-٤ سيفالوسبورينات الجيل الرابع Fourth generation cepalosorines

97- ، وتعد من Cefpirome و Cefepime تضم هذه المجموعة كلاً من مضادي المضادات المهمة المستخدمة حديثاً في المجالات الطبية المختلفة لما لها من تأثيرات علاجية

) تمتاز بفعالية عالية ضد افراد العائلة المعوية Angelescu & Apostol,2001ناجحة (
مضاد حديث Cefepime) ،والـ Mahon&Manuselis,2000) *P.aeruginosa*وبكتريا
. اما البكتريا Cefotaximeذو طيف واسع مقارنة بالجيل الثالث من السيفالوسبورينات مثل
*S.aureus,Neisseria , Pseudomonas*الحساسة لهذا المضاد فتشمل العائلة المعوية و
Varnamو Jones المرجاني،٢٠١١) ،كما أشار الباحثان Tam *et al*.,2002;والمسبحيات (
ثابتاً ومستقراً أمام أنزيمات البيتالاكتاميز المحللة التي تفرز منCefepime(٢٠٠٢) الى أن الـ
).Angelescu & Apostol,2001قبل البكتريا السابة لصبغة غرام(

98- ٢-١-٥-٢Fifth generation سيفالوسبورينات الجيل الخامس cephalosporins

99- المقاومة *S.aureus* ذو الفعالية ضد بكتيريا Ceftobiprole مثالها مضاد
المقاومة للبنسلين ، يعطى *Streptococcus pneumonia*) وبكتريا MRSAللمشلين (
بالحقن لعلاج اصابات الجلد والانسجة الرخوة (المرجاني ، ٢٠١١).

100-

101- ٢٥- ٣-١- Carbapenems الكربابنيم

102- فضلاً Meropenem ومضاد Imipenemتضم مجموعة من المضادات منها
الذي يعطى عن طريق الفم Faropenemعلى المجموعة الحديثة التي تشمل
)Dalhoff *et al*.,2003;Ueda & sunagawa,2003(

103- أول مضاد ضمن هذه المجموعة الذي يمتاز بفعالية Imipenemويعد مضاد
P.aeruginosa) Pai *et* واسعة الطيف ضد العصيات السالبة لصبغة غرام وبكتريا
al.,2001; Turnidge *et al*.,2002) له فعالية ضد أفراد العائلة المعوية
Enterobacteriaceae) Katazung,2001 (Imipenem لعلاج حالات . يستعمل مضاد
Nosocomialالتجرثم الدموي وإصابات المجاري البولية والاصابات الرئوية المكتسبة (
Pneumoniae) (Laurance *et al*.,1997 اثناء مدة الرقود في المستشفيات) اما مضاد
katzung,2001) فله فعالية عالية ضد البكتريا الهوائية السالبة لصبغة غرام (Meropenem
على البكتريا Bacteriocidal، وتمتاز مضادات الكربابنيم بتأثيرها القاتل
).Ueda&sunagawa,2003(

104- ٤-١-٥-٢Monoactom المونوباكتام

105- أول أفراد هذه المجموعة ، وهو يمتلك فعالية ضد Aztreonamيعد مضاد البكتريا السالبة لصبغة كرام ومنها ، *P.aeruginosa* ,*Neisseria gonorrhoeae*, يشبه Aztreoname)، ومضاد *Haemophilus influenzae*)Laurence *et al*.,1997 في فعاليته ضد العصيات السالبة لصبغة غرام ولكن ليس له فعالية Ceftazidimeمضاد الـ ضد البكتريا الموجبة لصبغة كرام و البكتريا اللاهوائية (Brooks *et al*., 2007.)

106- الكارباسفيم ٢-٥-١-٥Carbacephems

107- تضم هذه المجموعة بالكاربون إذThiozolidine تستبدل فيها ذرة الكبريت في حلقة مضاد Loracarbefمثل الفعال ضد البكتريا الموجبة لصبغة كرام *Staphylococcus* (المرجاني ، ٢٠١١) ، وبسبب الزيادة في كلفة هذا المضاد استبعد من الاستخدام كخط علاج أول .

108- الامينوكلايكوسيدات ٢-٥-٢Aminoglycosides

109- تضم مجموعة من المضادات منها Streptomycin, Neomycin, Amikacin , Tobramycin, Gentamicin , Kanamycin, Sisomicin ,Netilmicin وهي تتشابه في الخواص الحركية والدوائية والتركيبية والسمية (المرجاني ٢٠١١) ، هذه Katzung,2001; المضادات تخترق الغشاء الخارجي للخلية البكتيرية بوساطة الانتشار عن طريق قنوات البورينات لكن هذه الالية غير ممكنة لجزيئات مضادات الامينوكلايكوسيدات كبيرة الحجم الا بوساطة النقل النشط فتنتقل غير الغشاء الخلوي الى السايتوبلازم وهي عملية تعتمد على الطاقة ، حال دخول المضادات الى داخل الخلية تعمل على تثبيط تصنيع)Brooks *et al*., 2007(البروتين وذلك من خلال ارتباطه بموقع الهدف على الوحدة الرايبوسومية الصغيرة Subunit30S) Brooks *et al*., 2007) ، تستخدم مضادات الامينوكلايكوسيدات في علاج)، تؤخذ عن Fluit *et al*.,2001الالتهابات التي تسببها البكتريا السالبة والموجبة لصبغة غرام (، وتظهر أعلى فعالية في المحيط طريق العضل لكونها قليلة الامتصاص في القناة الهضمية)، Brooks *et al*., 2007القاعدي ولها اعراض جانبية على العصب السمعي وعلى الكلية (ذا اهمية كبيرة في علاج التهابات المجاري البولية وهو Gentamicinيعد مضاد الجنتامايسين من علاجات الخط الاول في هذا المجال ، كما يكثر استخدامه كمضاد أولي ضد البكتريا المعوية Thureen *et al*.,1999.)

110- وهو من المضادات شبه المصنعة المشتقة من Amikacinأما مضاد الاميكاسين وفعال ضد عدد كبير من أفراد العائلة المعوية ، وبكتريا Kanamycinالكانامايسين ، فهو مقاوم لاكثر الانزيمات المشفرة بالبلازميدات *P.aeruginosa* Plasmid Mediated Enzyme التي تتواسط المقاومة لـ Streptomycin ,Gentamycin) ;Katzung,2001 Rotschafer&Peterson,2004. (

111-

112- ٢-٥-٣ الكوينولونات Quinolones

113- تقوم هذه المجموعة من مضادات الحياة بتثبيط انزيمات (DNA Gyraseالمسؤول عن جعل الكروموسوم البكتيري فائق اللف وبالتالي يؤدي الى الموت السريع للبكتريا (FunG-; ومن العقارات المهمة التابعة لهذه المجموعة Brooks *et al*., 2007 Tomc *et al*.,2000 الجيل Nalidixic acid ويمثل مضاد Ciprofloxacin, Ofloxacin, Nalidixicacid (Ciprofloxacin) ، أما مضادات Katzung,2001الاول ، ويعد من الكوينولونات القديمة (فتمثلان الجيل الثاني من مجموعة الكوينولونات والتي تمتاز Ofloxacin وNorfloxacinو ، *P.aeruginosa* بطيف واسع ضد البكتريا السالبة لصبغة غرام عموماً ومن ضمنها بكتريا وتعد من أنجح المضادات الحيوية استعمالاً في معالجة التهابات المجاري البولية والالتهابات المعوية Brooks *et al*., 2007.(

114- ٢-٥-٤ السلفوناميد والتراي مثبريم Sulfonamides & Trimethoprime

115- إذ تقوم Bacteriostaticتمتلك هذه المضادات فعالية تثبيطية لنمو البكتريا مركبات السلفا بايقاف نمو البكتريا من خلال تثبيط أنزيم Dihydropteroate Synthetase بتثبيط أنزيم Trimethoprime ، بينما يقوم الـ Dihydro Folate reductase (DHPS) وهذه الانزيمات ضرورية في صنع حامض الفوليك البادئ في تصنيع الحامض (DHFR) النووي في خلايا البكتريا Brooks *et al*., 2007.(

116- يعملان على Sulofonamide وTrimethoprimeوبما ان كلاً من مضادي اغلاق المسار الايضي لتصنيع حامض الفوليك لهذا فهما يستعملان معاً إذ يعملان تآزرياً مما يستخدم هذا خليطاً في علاج إصابات Katzung,2001يجعل تأثيرهما التثبيطي أكبر (المجاري البولية المعقدة Brooks *et al*., 2007.(

117- ٢-٥-٥ النيتروفيورانتوين Nitrofuantoin

118- أستخدم منذ زمن بعيد بوصفه مضاداً فعالاً في علاج التهابات المجاري البولية وله فعالية ضد العديد من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام وتزداد فعاليته عند الرقم الهيدروجيني pH 5.5) Katzung,2001)، يستخدم لعلاج التهابات المجاري البولية وبالاخص لدى النساء الحوامل لما له من تأثير قاتل للبكتريا المسببة للالتهابات كما انه قليل التأثير على النساء الحوامل (Joklik *et al*., 1992) . إن اعطاء جرعة واحدة يومياً (١٠٠ملغم) من هذا المضاد تمنع تكرار إصابة المجاري البولية عند بعض النساء (Katzung,2001.)

٢-٦ مقاومة الزوائف الزنجارية للمضادات الحيوية -119

Antibiotic Resistance of *P.aeroginosa*

120- تمتلك بكتريا *P.aeruginosa* حساسية قليلة تجاه معظم مضادات الحياة المستعملة هذه البكتريا تشكل خطراً شديداً على صحة الانسان ، مما جعل في العلاج الطبي (Japoni *et al*., 2006).

121- يعود سبب مقاومة هذه البكتريا للمضادات الحيوية الى امتلاكها مورثات (جينات) التي تسبب تطور المقاومة للمضادات الحيوية، Plasmid المقاومة المحمولة على البلازميدات وزملاؤه (٢٠٠٤) الى ان الاستعمال العشوائي المتزايد Raka)) . اشار Baho,2006(لمضادات البيتالاكتام في علاج الالتهابات المختلفة ادى الى ازدياد المقاومة للمضادات الحيوية من قبل البكتريا المسببة لهذه الالتهابات.

122- قام كل من Sriram و Hauser بتقسيم مقاومة بكتريا *P.aeruginosa* الى (٢٠٠٥) مجموعتين رئيستين الاولى المقاومة الذاتية (Internsic susceptibilility) التي تحدث مما يجعل هذه البكتريا قليلة التأثر بالمضادات *P.aeruginosa* بصورة طبيعية في بكتريا مقارنة بالأجناس الاخرى السالبة لصبغة كرام Cephalosporin و Ampicillin الحيوية مثل بسبب عدم نفاذية جدارها الخارجي ، وقابليتها على نقل المضادات الحيوية خارج الخلية ، وتستعمل هذه التسمية للدلالة على المقاومة الطبيعية للبكتريا التي تكون الخصائص الوراثية هي المسؤولة عن منع فعل المضاد الميكروبي.

123- أما المجموعة الثانية فهي المقاومة المكتسبة للبكتريا (Aquired Susceptibility) التي تكون نتيجة لظهور سلالات مقاومة من المجتمعات البكتيرية الحساسة سابقاً التي تظهر بعد تعرضها لمضاد معين ويكون سببها وجود بلازميد المقاومة أو عوامل قافزة أوأنتجرونات أو نتيجة لحصول طفرات كروموسومية (Takeda *et al*.,2007).

العديد من الآليات لمقاومة المضادات الحيوية تشمل :*P.aeruginosa* تمتلك بكتريا -124

125-

126- ٢-٦-١ إنتاج أنزيمات محللة لبعض انواع المضادات الحيوية

127- Production of antibiotic degrading enzymes

128- في هذه البكتريا وصنفت الى مجموعات اعتماداً *β*-lactamase تم اكتشاف إنتاج أنزيمات (التي تعمل عليها ، أو مواقع جيناتها التي قد تحمل على الدنا Substrateعلى الركيزة) لذا تدعى β.Lactamsالبلازميدي أو الدنا الكروموسومي وهي تعمل على مجموعة مضادات Cephalosporinase) Cavallo *et al* و Pencillinaseبأنزيمات البيتالاكتاميز وتشمل تعمل هذه الانزيمات على كسر آصرة الامايد في حلقة البيتالاكتام الموجودة في).2000,. الناتج Pencillonic acidمضادات البيتالاكتام لتحويلها الى المركبات فاقدة الفاعلية (حامض الناتج من تحطم السيفالوسبورينات (Cephalosporinic acidمن تحطم البنسلينات و المرجاني ،٢٠١١).

129- (منها التي تساعد Modifying enzymesكما وجدت أنزيمات تعرف بالانزيمات المحورة) Gentamicinالبكتريا على مقاومة مضادات المجموعة الامينوكلايكوسيدية مثل)Hasegawa *et al*.,1996.(

130- ٢-٦-٢ تحوير الموقع الهدف لعمل المضاد Modification of antibiotic target

131- تمكن هذه الآلية البكتريا من تطوير مقاومتها لأنواع عدة من المضادات الحيوية ، إذ تحصل المقاومة عن طريق تغير موقع الهدف الذي يعمل عليه المضاد الحيوي بسبب حدوث طفرة وراثية في مواقع ارتباط المضاد الحيوي مع المكان الخاص به في الجرثومة ، وبذلك يفقد المضاد الحيوي الفته للارتباط مع الموقع الهدف ، وهذا يؤدي الى مقاومة البكتريا للمضادات) الحيويةWalsh,2000.(

132- إن هدف مضادات البيتالاكتام هو مجموعة من الانزيمات تدعى بالبروتينات (والتي تشارك في المرحلة PBPs (Penicillin Binding Protiens المرتبطة بالبنسلين للجدار الخلوي للبكتريا Peptidoglycanالاخيرة من عملية بناء طبقة الببتيدوكلايكان (المرجاني،٢٠١١) ، البروتينات المرتبطة بالبنسلين هي مجموعة من أنزيمات Transpeptidase Transglycosylase, Carboxy Peptidases)Hebeisen *et al*.,2001.(

133- يحدث احياناً تحوير في هذه البروتينات مما يؤدي الى تناقص الالفة لمضادات البيتالاكتام ، وفي بعض الحالات تصبح هذه البروتينات اقل حساسية لعملية الاستلة (acylation) والتثبيط بوساطة المضادات (Cao *et al*.,2002; Neuwirth *et al* .,2001.)

134- ظهر انها تكمن في Flouroquinolonesوعند دراسة الية المقاومة لمضادات من نوع تحوير الهدف الذي يعمل عليه المضاد وهو DNA gyrase) Lei *et al*.,1991.)

135- ٢-٦-٣ التحوير في حاجز النفاذية Alteration in Permeablity barrier

136- إمتلاك حاجز النفاذية من أهم الوسائل التي تتمكن بوساطتها البكتريا السالبة لصبغة Selective Permeability غرام من مقاومة المضادات الحيوية وبسبب طبيعتها الاختيارية ( ) فان البكتريا السالبة لصبغة كرام تحتاج الى تراكيز عالية من المضاد لقتلها مقارنة barrier)، تعتمد Spanu *et al*., 2002 ; Winokur *et al*.,2001 بالبكتريا الموجبة لصبغة كرام (نسبة النفاذية على حجم وشكل وشحنة جزيئات المضاد المارة من خلال ثقوب متخصصة ذات) وتنتظم بشكل قنوات تسمح بمرور الجزيئات Hydrophilic طبيعة بروتينية محبة للماء ( ) الى الفسحة البريبلازمية ، وتدعى هذه القنوات Water Soluble الصغيرة الذائبة في الماء ( ) وتدعى طريقة Transmembrane diffution Chanals بقنوات الانتشار عبر الغشاء ( ) Hydrophilic uptake pathway العبورعبرهذه القنوات بطريقة الامتصاص المحب للماء( ) . اشارت الدراسات الى وجود نوعين اساسين من هذه المسامات Koneman *et al* .,1992( ) ، تعد هذه المسامات الممر Outermembrance porin F.C) (OMPF ,OMPC هما (، وان اختزال عدد هذه الثقوب في الغشاء الخارجي الرئيسي الاساس لعبور مضادات البيتالاكتام لبعض انواع البكتريا يؤدي الى التقليل من تدفق المضاد عبر هذه الاغشية وبالتالي تصبح البكتريا مقاومة لمضادات البيتالاكتام (Nikaido *et al*.,1985.)

137- ٤-٢٦- مضخات الدفق Drug Efflux Pumps

138- وهي الالية التي تزيد من مقاومة الجراثيم للمضادات الحيوية نتيجة لفرط التعبير في منع النفاذية في السلالات عديدة المقاومة ( )، تمتلك Morshed *et al*.,1995 مقاومة متعددة للمضادات الحيوية تعود غالباً لنفاذية غشاءها المنخفضة *P.aeruginosa* بكتريا) ، وهي سلسلة Multi drugs efflux Pumps ولوظيفة مضخات دفق العقاقير المتعددة (متعددة العناصر، والاجزاء تلعب دوراً مهما في المقاومة الطبيعية ، والمكتسبة للبكتريا السالبة *P.aeruginosa* (Zgurskaya & Nikado 1999 .) لصبغة كرام ومنها

139- Mex AB Mpump انظمة الدفق من نوع *P.aeruginosa* في الطراز البري لبكتريا يحدث فرط mex R او nalB)، عند حدوث طفرة في الجين المنظم ;Poole *et al*.,1996(ويصبح الكائن اكثر مقاومة من Mex ABM pumpفي التعبير عن نظام الدفق من نوع لذا فان). Masuda *et al*.,2001 السلالة البرية للمدى نفسه من مضادات الحياة (يلعب دوراً مركزياً في مستويات المقاومة الطبيعية Mex ABM Pumpنظام الدفق Guan (*P.aeruginosa*والمستويات المتصاعدة لتعدد المقاومة لمضادات الحياة في بكتريا & Nakae,2001. (

140- اي تضخ اكثر من مضاد مثالها Multi Purposeتكون بعض المضخات متعددة تضخ التتراسايكلين والسبرفلوكساسين والكلورمفنكول *P.aeruginosa*مضخة في بكتريا والارثرومايسين والبنسلين ، وتوجد مثل هذه المضخات في بكتريا اخرى مثل بكتريا التي تضخ السبروفلوكساسين والمضادات ذات العلاقة (المرجاني ،٢٠١١).*Staph.aureus*

141- ٢٦- ٥ زيادة إنتاج المواد التنافسية

142- Increase Production Of Competitive Compounds

143-) التي توقف تكوين حامض Sulfa توجد هذه المقاومة عادة ضد مركبات السلفا ( ) في تخليق الاحماض النووية ، يدخل في Precursorالذي يعد بادئ (Folic acidالفوليك (Para-) مركباً أولياً يدعى Folic acidالمسار الايضي لصنع حامض الفوليك (aminobenzoic acid) PABA يتفاعل مع مركب (Hydroxymethyl dihydroptridine بوجود أنزيم Dihydropteraic synthetase) DHPS) ليعطي مركب Dihydrofolate بوجود انزيم Tetrahydrofolic وهذا بدوره يتحول الى Folic acid التي تدخل في صنع Purines و Pyrimidines) من ثم يتحول الى DHFR (Reductase DNA) ; Poole,2002 المرجاني،٢٠١١)، يعمل مضاد Trimethoprime في حين يثبط مضاد DHPS على تثبيط عمل انزيم Sulphonamide بانزيم البكتريا بالفة اعلى ٦٠ الف مرة من Trimethoprime) يرتبط مضاد DHFRانزيم ( ) لكي تدخل PABAالفة ارتباط انزيم الانسان ، تقاوم البكتريا هذه المضادات بزيادة انتاج مادة (وبالتالي يستمر صنع Sulphonamideمسار صنع حامض الفوليك وتنافس بذلك مضاد المرجاني،٢٠١١).; Wright,2003 (Folic acideحامض الفوليك

144-

145- ٦-٦-Slime layer الطبقة المخاطية 2

146- هنالك عامل وظيفي آخر يساعد البكتريا في مقاومة مضادات الحياة وهو وجود طبقة مخاطية (Slime) تحيط بالخلية تكون حرة غير مرتبطة وعند ارتباطها بالجدار تعرف بالمحفظة (Expolysaccharide alginate) أو (glycocalyx)، تتكون من مادة كربوهيدراتية تعرف ، إذ تفرز هذه المادة بكميات كبيرة وخاصة عند الاصابة بمرض التكيس الليفي في الرئة لذا أحد أهم مظاهر التشخيص لحالات الاصابة *P.aeruginosa* أصبح المظهر المخاطي لبكتريا (Hanna *et al*.,2000) في التكيس الليفي

147-

١٤٨- ٢-٧ أنزيمات البيتالاكتاميز *β* -Lactamase Enzyme

١٤٩- تستطيع العديد من الانواع البكتيرية انتاج انزيمات تعمل على تحطيم مضادات البنسلينات والسيفالوسبورينات والكاربابنيم (Carbapenems) وتدعى هذه الأنزيمات أنزيمات البيتالاكتاميز – *β* Lactamase (المرجاني ، ٢٠١١) ، ويعود إكتشاف هذه الأنزيمات الى الباحثين Abraham & Chain عام (1940) عند ملاحظتهما أن مستخلص سلالة *E.coli* قد حطم البنسلين ولهذا أطلق على هذا الأنزيم أسم البنسيلينيز Penicillinase (Ambler,1980).

١٥٠- يعد أنزيم البيتالاكتاميز أحد الأنزيمات التابعة للمجموعة المميئة Hydrolases ذات الرقم التصنيفي (amino hydrolases E.C 3.5.2.6) وهو ينتمي إلى عائلة السيرين (Serine family) الحاوية على الحامض الاميني سيرين بمجموعته الهيدروكسيلية ويعد الموقع الفعال Active site لفعالية الأنزيم (Bush *et al.*, 1995; Sander *al.,* 1993 *et*). تنتج هذه الأنزيمات من البكتريا فقط ولها صفة دفاعية متخصصة ضد مضادات البيتالاكتام التي تمنع تكوين طبقة الببتيدوكلايكان (Peptidoglycan) في الجدار الخلوي (Amyes& Gemmel, 1997) ، وربما تكون أنزيمات البيتالاكتاميز مشتقة من أحد الأنزيمات الداخلة في تصنيع طبقة الببتيدوكلايكان (Koch,2000).

١٥١-

١٥٢- ٢-7-1 آلية عمل أنزيم البيتالاكتاميز The Mechanism of β-Lactamase Action

١٥٣- تمتلك البكتريا وسائل دفاعية عدة لحماية خلاياها من التحلل بوساطة مضادات البيتالاكتام ، ومن هذه الوسائل أنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز (Livermore, 1995) ويعتمد عمل المضاد على عدة عوامل منها الموقع Location ، وكمية الأنزيم المنتج ، وجزيئات المضاد العابرة عبر الأغشية , والحركيات (Kinetics) وعلى الظروف الفيزوكيميائية Physiochemical condition (Livermore,1995). تعمل هذه المضادات على منع تكوين الجدار الخلوي للبكتريا الذي يتكون أساساً من طبقة أساسية تدعى البيتيدوكلايكان، وهي تتكون من وحدتي سكريات أمينية (Aminosugars) مترتبة تبادلياً تدعى الوحدة الأولى N-acetyl muramic acid والثانية N-acetyl glutamic acid (Koch,2000) .

١٥٤- تعمل أنزيمات البيتالاكتاميز على تثبيط عمل مضادات البيتالاكتام من خلال كسرها لأصرة الأمايد (Amide bond) الموجودة في حلقة البيتالاكتام (β -Lactam ring) (Hall *et al*., 2004) مؤدية إلى تحطيم جزيئة المضاد، يتحول بعدها المضاد ألى مركب فاقد الفاعلية . يطلق على المركب الناتج من تحطيم البنسلينات أسم حامض البنسلويك Penicilloic acid ويحتوي على مجموعتين حامضيتين في حين هناك مجموعة واحدة في المركب الأصلي ويكون المركب الجديد مستقراً(Livermore, 1995) ، بينما ينتج مركب وسط غير مستقر يدعى حامض السيفالوسبوريك Cephalosporic acid من تكسير السيفالوسبورينات ، وسرعان ما يتفكك الى جزيئتين غير فعالة (Livermore, 1995).

١٥٥-

١٥٦- ٢-٧-٢ تصنيف أنزيمات البيتالاكتاميز Classification of β -Lactamase

١٥٧- هناك اعداد كثيرة وانواع مختلفة من انزيمات البيتالاكتاميز فيوجد على الأقل ٣٤٠ انزيم بيتالاكتاميز بكتيري مختلف تم وصفها مما يجعل من تصنيفها امراً صعباً ، وهناك نظامان لتصنيفها:

١٥٨- أولهما تصنيف Ambler الذي يعتمد على التشابه في تتابع الأحماض الأمينية والنظام الثاني هو نظام Bush-Jacoby-Medeiros الذي يعتمد على نسق المثبط-المادة الأساس (المرجاني ، ٢٠١١). هناك اربعة اصناف حسب تصنيف Ambler:

١٥٩- صنفA: وهي أنزيمات البنسلينيز (Penicillinase) والسيفالوسبورينيز (Cephalosporinase) التي تشفر بالبلازميدات او بالقافزات (الترانسبوزونات).

١٦٠- صنف B: وهي أنزيمات البيتالاكتاميز المعدنية Metallo β- Lactamase.

١٦١- صنف C: وهي سيفالوسبورينيز كروموسومية .

١٦٢- صنف D: وهي Oxacillinase.

١٦٣- أنزيمات صنف A تعد اكثرها شيوعاً ثم أنزيمات صنف C (المرجاني ، ٢٠١١).

١٦٤- أما تصنيف Bush-Jacoby-Medeiros فهو كذلك يضم اربعة اصناف او مجموعات هي:

١٦٥- المجموعة الأولى: السيفالوسبورينيز المشفرة كروموسومياً والتي تكون ضعيفة التثبيط بحامض الكلافيولنك .

١٦٦- المجموعة الثانية:البنسلينيز ، والسيفالوسبورينيز، والأنزيمات واسعة التخصص التي تضمن Carbapenemases سواء المشفر بلازميدياً او كروموسومياً والتي تثبط الكلافيولنك ومثبطات اخرى للبيتالاكتاميز .

١٦٧- المجموعة الثالثة : Metallo β- Lactamas وهي انزيمات لا تتأثر بجميع مثبطات البيتالاكتاميز .

١٦٨- المجموعة الرابعة : تضم عدداً محدوداً من انزيمات البنسلينيز غير الموصوفة التي لا تثبط بحامض الكلافيولنك . (المرجاني ، ٢٠١١).

١٦٩-

١٧٠- ٢-٧-٣ العوامل الوراثية المسيطرة على أنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز:

١٧١- يخضع أنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز لسيطرة عوامل وراثية مختلفة ويمكن تقسيمها إلى:

١٧٢- ٢-٧-٣-١ أنزيمات البيتالاكتاميز الكروموسومية Chromosomal β -Lactamase

١٧٣- تنتج معظم أفراد البكتريا السالبة لصبغة كرام وفي مقدمتها أفراد العائلة المعوية والزوائف الزنجارية أنزيمات البيتالاكتاميزالكروموسومية ، وتحمي هذه الأنزيمات الخلية البكتيرية ضد العديد من مضادات البيتالاكتام وتكون الجينات المسؤولة عن تشفيرها محمولة على كروموسوم الخلية (Jacoby&Sutton , 1985) وتقسم الأنزيمات الكروموسومية على قسمين :

١٧٤- أ-الأنزيمات الكروموسومية منتظمة التكوين Constitutive enzymes

١٧٥- تنتج هذه الأنزيمات بشكل طبيعي ومنتظم من دون الحاجة الى وجود عوامل محفزة، ويكون أنتاجها بمستويات واطئة (الطائي ، ٢٠٠٥).

١٧٦-

١٧٧- ب- أنزيمات كروموسومية محفزة Inducible enzyme

١٧٨- ينتج هذا النوع من الأنزيمات بوجود محفز (inducer) وتسمى أنزيمات عالية التحفيز High inducible enzyme لتحولها من قليلة ألى عالية الأنتاج الأنزيمي ويخضع أنتاج هذا النوع من الأنزيمات لجينات تركيبية Structural genes ينظم عملها جين كابح Repressor gene وجينات تنظيمية Regulatory genes وأن حدوث طفرة وراثية في الجينات التنظيمية أو في الجين الكابح المنظم لعمل الجينات التنظيمية يؤدي الى زيادة أنتاج هذا النوع من الأنزيمات (Benett&Chapro,1993) ، تزداد خطورة هذه الخلايا الطافرة عند تحول أنتاجها الأنزيمي من النوع المحفز ألى منتظم التكوين (Matsumoto &Inoue,1999)، وهي تمتاز بالفة عالية لمضادات السيفالوسبورينات كمحفزات جيدة قياساً بالبنسلينات ، كما أنها لا تتأثر بالمثبطات العادية مثل Clavulanic acid ، Tazobactam ، Sulbactam بل بمثبطات أخرى مثل Coxacillin (Livermore,1995).

١٧٩- ٢-7-3-٢ أنزيمات البيتالاكتاميز البلازميدية β-Lactamase–Plasmid-mediated

١٨٠- هناك عدة أنواع من البلازميدات ومن أهمها من الناحية السريرية البلازميدات الحاملة لجينات مقاومة المضادات الحيوية وجينات الضراوة ، ويمكن تقسيمها ألى مجموعتين، البلازميدات الأقترانية (Conjugative plasmids) وتمتاز هذه البلازميدات بقابليتها على الأنتقال الذاتي Self-transmissible plasmids لأحتوائها

على نوعين من الجينات تساعد الأولى في عملية الأتصال ويعرف النوع الثاني من الجينات Tra genes ويساعد البلازميدات على الأنتقال من الخلية الواهبة (الذكرية) ألى المستلمة (الأنثوية) عبر الجسور الرابطة ، المجموعة الثانية البلازميدات غير الأقترانية (Nonconjugative) وهي غير قابلة للأنتقال ولكنها يمكن أن تكون محركة بوساطة بلازميدات أقترانية أخرى عندما تكون منطقة التعبئة لها (mobilizing region) فعالة (Tortora *etal*.,2007;Ryan & Ray , 2004) . تعد بلازميدات المقاومة (R-Plasmid) واسعة الأنتشار في البكتريا السالبة لصبغة غرام وخاصة في العائلة المعوية ومنها بلازميد RTEM-1 والذي تتراوح نسبة أنتشاره ما بين (70-100) % (Couturer *et al.*,1988)، وكذلك البلازميد RP1 المعزول من بكتريا *P.aeurginosa* والمشفر لمقاومة الكاربنسلين (Data *et al.,*1971).

١٨١- تعد الأنزيمات المشفرة بلازميديا ًالأكثر اهمية في البكتريا السالبة لصبغة كرام ، حيث تم التوصل الى ان عدد البلازميدات المشفرة لأنزيمات البيتالاكتاميز الى اكثر من ٧٥ بلازميد مختلف في العصيات السالبة لصبغة كرام منتشر في كل انحاء العالم . تمتاز هذه الأنزيمات بكونها منتظمة التكوين وتعمل على مضادات البنسلينات والسيفالوسبورينات كمادة اساس ،كما إنها تثبط بأغلب المثبطات المعروفة مثل , Clavulanic acid Sulbactam , Tazobactam على العكس من الأنزيمات الكروموسومية (Marchandin *et al* ,2000) .

١٨٢- ٢-7-3-٣ أنزيمات البيتالاكتاميز التي تتواسطها جينات قافزة

183- **Transposons mediated β -Lactamase**

١٨٤- العناصر القافزة هي تسلسلات من DNA التي تستطيع القفز من موقع الى آخر في جينوم الخلية بعملية تسمى القفز (Transposition) ، وأكتشفت في البكتريا عام 1987 وأطلق عليها التسلسلات المنغرزة (Insertion sequences) (Freifleder,1987).

١٨٥- وتصنف الترانسبوزونات ألى صنفين:

١٨٦- **الترانسبوزونات البسيطة** مثل Tn3 فإنه يشفر لمقاومة مضادات البيتالاكتام من خلال تشفير لأنزيمي TEM-1، TEM-2 (Jacoby,1994) . وأثبتت صفة القفز الخاصة بجين أنزيم TEM-1 لأول مرة من قبل Datta وجماعته(1971) . وهناك بعض البلازميدات تحمل ترانسبوزوناً واحدا" أو أكثر يحمل جينات تشفر

لصفة المقاومة لمضاد حيوي واحد أو أكثر كما لها ألقدرة على القفز من بلازميد إلى آخر ومن بلازميد إلى الكروموسوم وبالعكس محدثة طفرة بعد أنغرازها في موقع ولتسلسلات معينة تدعى تسلسلات الهدف (Target Sequences) وهي بذلك تزود البكتريا بالإمكانية على التكيف في بيئات معينة مثل المستشفيات إذ تصبح البكتريا مقاومة نتيجة أنتقال جين المقاومة أليها بعملية القفز (Prescott *et al* ., 2005) .

١٨٧- **الترانسبوزونات المركبة** وهي التي تحتوي على عناصر الأقحام Insertion Sequences IS عند نهايتي الترانسبوزونات المركبة مثل Tn5 إذ تحمل قطعة الدنا (DNA) بين تسلسل IS جيناً يشفر لمقاومة الكانامايسين (Freifelder,1987).

١٨٨-

١٨٩- ٢-7-٣-٤ أنزيمات البيتالاكتاميز التي تتواسطها الأنتجرونات:

190- Integrons-mediated β -Lactamase

١٩١- الأنتجرون عنصر وراثي متخصص يسمح للجينات بالحركة بوساطة عمليات إعادة أرتباط متخصصة الموقع ، ويتألف الأنتجرون من جين يشفر لأنزيم الأنتيجريز مع كاسيتات (Cassette) جين مجاور التي تحتوي بصورة شائعة على جينات مقاومة المضادات الحيوية (Recchia&Hall ,1995).

١٩٢-

١٩٣- ٢-٧-٥ أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف

194- Extended Spectrumβ-Lactamases (ESBLS) :

١٩٥- أدى الإستخدام الواسع لمضادات سيفالوسبورينات الجيل الثالث في المجال الطبي العملي منذ سنة ١٩٨٠ الى إحداث تغييرات في أنزيمات البيتالاكتاميز ، وظهور أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف (ESBLs) ، والتي تعد من الأسباب المهمة التي ساعدت البكتريا على مقاومة مضادات البيتالاكتام الحديثة (المرجاني ، ٢٠١١).

١٩٦- تمثل حقبة الثمانينات بداية ظهور الأنزيمات واسعة الطيف عندما أكتشف SHV-2 ثم أعقبه إكتشاف TEM-3 ثم توالت الأكتشافات فوصل عدد الأنزيمات التابعة لعائلة TEM الى ما يزيد على ٩٠ نوعا" وهناك

٢٥ نوعا" ضمن عائلة SHV فضلا" عن أنواع أخرى (Bradford , 2001) . تحتوي انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBL على السيرين في الجزء الفعال وهي تعود الى صنف A حسب تصنيف Ambler الجزيئي(Amblir's molecular class A) وان هذه الانزيمات لها القدرة على تحليل مادة – Oximino Cephalosporine وهي تثبط بوساطة حامض الكلافيولنك و التازوباكتام (Yan *et al* .,2006) . أول ظهور لهذه الأنزيمات كان ضمن العائلة المعوية وعائلة الزوائف وذلك نتيجة الأفراط في إستخدام مشتقات البيتالاكتام الحديثة وخاصة السيفالوسبورينات (Sanders *et al.*, 1993) ، وبالرغم من أمتلاك هذه البكتريا لأنزيمات كروموسومية محفزة فإن أنتشار المقاومة بينها بشكل واسع يعود إلى أنتاجها لأنزيمات مشفرة بلازميدياً قادرة على تحطيم مجاميع مضادات البيتالاكتام الحديثة (Jacoby , 1994) ومنها :

١٩٧- 1- مجموعة Imino methoxy cephalosporins التي تضم مضادات Cefotaxime، Ceftazidime، Ceftriaxone.

١٩٨- 2- مجموعة Oxyimino monobactam مثل مضاد Aztreonam.

١٩٩- 3- مجموعة α-methoxy cephosporin وتضم مضاد Cefotetan، Cefoxitin.

٢٠٠- 4- مجموعة Carbapenems ومنها مضاد Imipenem.

٢٠١- تنتج أغلب أنزيمات واسعة الطيف (ESBLs)عن طريق حدوث طفرات في الجينات البلازميدية المشفرة لانزيمات البيتالاكتاميزنوع (TEM,SHV) مؤدية إلى حدوث تغير في تناسق أو ترتيب الأحماض الأمينية للموقع الفعال (Active site) (Jacoby,1994; المرجاني ، ٢٠١١) . تحمل الجينات المشفرة لأنزيمات واسعة الطيف عادة على بلازميدات متنقلة ذاتياً (Self transferable) ذات وزن جزئي عالٍ وتحمل صفة المقاومة المشتركة لمضادات أخرى مثل Tetracycline، Aminoglycosides، Chloramphenicol، Trimethoprim، Sulfonamid (Rice *et al.*, 1990) ، من الممكن تشفير هذه الأنزيمات عن طريق جينات محمولة على العناصر القافزة (Tranposable elements) وهذا يسهل أنتقالها بين البلازميدات وبالتالي أنتشارها في أغلب أجناس العصيات السالبة لصبغة غرام (Jacoby,1994) ، تمتلك أنزيمات واسعة الطيف ألفة عالية للأرتباط مع مثبطات بيتالاكتاميز مثل Tazobactam، Sulbactam،

acid Clavulanic لذا تخلط مضادات البيتالاكتام سواء البنسلينات أو السيفالوسبورينات مع هذه المثبطات لأيقاف فعالية أنزيمات واسعة الطيف (Jacoby & Mederiors , 1991) .

٢٠٢ ـ ٢ـ٨ـمثبطات البيتالاكتاميز β-Lactamase Inhibitors :

٢٠٣ـ تدعى مثبطات البيتالاكتاميز بالمثبطات الإنتحارية Suicide inhibitors (Francioll ,1991) لتكوينها معقدات ثابتة بينها وبين الأنزيم نتيجة تفاعل كيميائي مكون من خطوات عدة مؤدية إلى قطع الطريق أمام الأنزيم وبالتالي منعه من تحطيم جزيئة مضاد البيتالاكتام الفعالة (Miller *et al*., 2001)، تتصف هذه المثبطات بكونها مضادات حيوية ضعيفة الفعالية ضد البكتريا إلاإنها قادرة على تثبيط أنزيمات البيتالاكتاميز البلازميدية والكروموسومية إذ ترتبط معها وتثبطها بتفاعل غير عكسي (Totir *et al*., 2007).

٢٠٤ـ من أهم مثبطات البيتالاكتاميز هي :

٢٠٥ـ ٢ـ8ـ١ مثبط حامض الكلافيولنك Clavulanic acid

٢٠٦ـ وهو مضاد حيوي ذو فعالية ضعيفة ضد البكتريا ولكنه يمتلك فعالية تثبيطية لمدى واسع من أنزيمات البيتالاكتاميز ، وقد تم عزله عام 1967 من العزلة *Streptomyces clavuligerus* (Murray *et al*., 1999) . يشابه هذا المركب نواة البنسلين ويختلف عنها بأمتلاكه السلسلة الجانبية اسيل أمين acyl amine كما يمتلك الأوكسجين بدلاً من الكبريت ويحتوي على β-Hydroxy ethlidine أحلت في Oxazolidine ring(Reading & cole , 1977).

٢٠٧ـ يمتلك حامض الكلافيولنك فعالية تآزرية مع البنسلينات والسيفالوسبورينات إذ يستخدم خلطاً مع مضاد Amoxicillin ويعرف تجارياً بـ (Augmentin) ويستخدم ضد الأصابات الناجمة من الممرضات المقاومة لمضاد Amoxicillin عند إستخدامه بمفرده (Rolinson ,1991)، وكذلك يخلط حامض الكلافيولنك مع Ticarcillin ويعرف بأسم (Timentin) التي تستخدم لعلاج اصابات بكتريا *P.aeruginosa* و*Haemophilus influenzae* كذلك يكون هذا الخليط فعالاً ضد بكتريا *Legionella pneumoniae* ووجد ان الكلافيولنك لوحده كفوء ضد هذه البكتريا وعند خلطه مع Amoxicillin او Ticarcillin يكون له فعل تأزري للأرتباط بأنزيم PBPs ، وفي داخل الخلايا يكون الكلافيولنك اكثر كفاءة من Amoxicillin و

Ticarcillin ضد بكتريا *Legionella pneumoniae* مما يدل على ان الكلافيولنك يخترق الخلايا أسرع من البنسلينات (المرجاني ، ٢٠١١). كما أن خلطه مع المضادات الحيوية يعمل على تثبيط أنزيمات البيتالاكتاميز المنتجة من *Staph aureus* والبكتريا السالبة لصبغة كرام خاصة تلك التي تتوسطها بلازميدات تعود لعوائل PSE، HMS، OXA، TEM (Fisher,1984).

٢٠٨-

٢٠٩- ٢-٨-٢ السلباكتام Sulbactam

٢١٠- يعد السلباكتام من المركبات شبه المصنعة وتركيبه هو 6-desaminopenicillin sulfone وهو مثبط فعال لأغلب أنزيمات البيتالاكتاميز المهمة سريرياً وهو أوسع طيفاً من حامض الكلافيولنك ولكنه أقل فعالية من حامض الكلافيولنك (Totir *et al.*,2007).

٢١١- يمتاز هذا المثبط بعدم أمتلاكه قابلية استحثاث الأنزيمات الكروموسومية (Mandell *et al.*,1995) لذا يستخدم ممزوجاً مع مضادات البيتالاكتام لعلاج الأصابات الناتجة من البكتريا المعوية المنتجة لأنزيمات سيفالوسبورنيز المستحثة Inducible Cephalosporinase (Kazmierzak *et al.*,1990). يمتلك مثبط السلباكتام فعالية تآزرية مع مضادات البيتالاكتام فهو يوجد مخلوطاً مع مضاد الأمبسلين بنسبة 2-1 (1 غم أمبسلين – 0.5 غم سلباكتام) كما أنه قليل الأمتصاص من الأمعاء لذا يؤخذ عن طريق الوريد (Intravenous administration) (Ripa *et al.*,1990).

٢١٢- يمتلك خليط الامبسلين-سلباكتام فعالية ضد البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام وكذلك ضد البكتريا اللاهوائية (Akalin,1999). تشير أغلب الدراسات إلى أمكانية إستخدام خليط (الأمبسلين-سلباكتام) كخط علاجي أولي لفعاليته العالية وسميته القليلة فضلاً عن إنعدام تأثيراته الجانبية وكلفته القليلة (Akalin,1999)، لذا فأن هذا الخليط يستخدم لعلاج أصابات عديدة منها أصابات داخل البطن Intra-abdominal وإلتهابات المجاري البولية (Oliver *et al.* , 1999).

٢١٣- ٢-٨-٣ التازوباكتام Tazobactam:

٢١٤- يعد مثبط التازوباكتم من المركبات شبه المصنعة وتركيبه هو(atriazolyl-substituted penicillanic acid sulfone)(Murray *et al.*, 1999).

٢١٥- يمتلك هذا المثبط تأثيراً متقارباً مع حامض الكلافيولنك والسلباكتام ، وذلك من حيث خفض التركيز المثبط الأدنى M.I.C ألى حوالي 20 مرة لعدة أنواع من البكتريا، وبالرغم من كونه مضادا" حيويا" ضعيفاً ضد البكتريا الآانه يمتلك فعالية تثبيطية لمدى واسع من أنزيمات البيتالاكتاميز (Murray *et al.*,1999).

٢١٦- يتوفر بشكل توليفة مع مجموعة اليوريد بنسلين مثل الببراسلين Piperacillin ويسمى (التازوسين)، ووجد أن له دوراً ناجحاً في إعادة فعالية مضاد الببراسلين ضد البكتريا المنتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز SHV، TEM والبكتريا اللاهوائية(Sweet *et al.*,1994). وأشار الباحث Frank وزملاؤه (2003) إلى إمكانية أستخدام خليط التازوباكتام / الببراسلين في علاج الأصابات المكتسبة من المستشفيات وخاصة بكتريا *E.coli* وبكتريا *Proteus vulgaris*وبكتريا *P.aeruginosa* كما أن له فعالية قوية لعلاج أصابات الجهاز التنفسي المزمن (Oizumi *et al.*,1995).

٢١٧- ولاحظ Babini وزملاؤه (2003) أن خليط الببراسلين/التازوباكتام فعال ضد عزلات *Klebsiella* و *P.aeruginosa* المنتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف Extended spectrum β lactamase ، وأستخدم Bantar وزملاؤه (2004) خليط التازوباكتام-ببراسلين في علاج التهابات المجاري البولية .

٢١٨-

٢١٩ - ٢- ٩ النسق البلازميدي لبكتريا الزوائف الزنجارية

220- *Pseudomonas aeruginosa* plasmid profile

221- البلازميد هو عبارة عن تركيب حلقي يتكون من خيطين حلزونيين من الـ DNA البكتيري ويعد من العناصر الوراثية خارج الكروموسومية وعادة ما تحمل البلازميدات جينات مسؤولة عن عوامل الضراوة او المقاومة للمضادات الحيوية في البكتريا (٢٠٠٠; Kaye *et al.,* Levy, 2001 .)

222- للبلازميدات قابلية على التضاعف الذاتي بدون الإعتماد على كروموسوم المضيف , كذلك يتميز البلازميد بأنه مستقر وراثياً Repliconلأحتوائها على منشأ التضاعف تدعى مثل البكتريا Prokaryotesويحتوي على جينات من (١-٣٠٠) جين ويوجد في بدائية النواة مثل الخمائر والفطريات وتكون الجينات المحمولة على Eukaryotesوكذلك في حقيقية النواة البلازميد غير ضرورية لحياة وتكاثر الخلية البكتيرية والبكتريا الفاقدة للبلازميد تكون طبيعية في وظائفها (Prescott *et al* ., 2005.)

223- تستطيع البلازميدات الانتقال من خلية الى اخرى بوساطة آلية تعرف بالاقتران التي من خلالها تنقل البكتريا الصفات الوراثية من خلية الى أخرى أو من (conjugation) بوساطة العاثيات البكتيرية (transduction)خلال الية اخرى تعرف بالتنبيغ Livermore,2000) (.

224- قد تحمل جينات المقاومة على الكروموسوم او البلازميد أو كلاهما معا وإليها يعزى انتقال صفة المقاومة لمضادات الحياة ، وتعرف البلازميدات الحاملة لجينات المقاومة ببلازميدات المقاومة(R-plasmids) وتعدّ مؤشرات جزيئية مهمة في الدراسات الوبائية (Lyobe *et al.,* 1994).

225- مأخوذة من *P. aeruginosa*في دراسة اجريت في الهند على ١٠ عزلات من بكتريا مصابين بالحروق ، اظهرت النتائج ان جميع العزلات تملك بلازميداً مفرداً متطابقاً كما ان صفة هي صفة محمولة على بلازميد المقاومة بينما صفة مقاومة Amikacinمقاومة مضاد الحياة كانت محمولة على الكروموسوم ،Carbenicillin والمضاد Clindamycinكل من مضاد الـ الى بكتريا Amikacinكما امكن خلال تلك الدراسة نقل البلازميد المسؤول عن صفة مقاومة التي كانت حساسة لجميع المضادات قبل نقل البلازميد اليها بعملية التحول *E. coli* (transformation) لتصبح بعدها مقاومة للمضاد Amikacin) Shahid & Malika, 2004. (

226- في احد *P. aeruginosa*وفي دراسة أخرى تم عزل البلازميدات من ٥٠ عزلة لبكتريا مستشفيات الصين ووجد انها تتشارك باحتوائها على بلازميد مقاومة وزنه الجزيئي ٥٥ كيلو زوج ، وفي ١٥ عزلة جمعت من اماكن متفرقة وجد ان ١٠ منها تحمل بلازميداً بذات الوزن قاعدة الجزيئي بينما احتوت ثلاث عزلات منها بلازميد اضافي وزنه الجزيئي ١٢.٥ كيلو زوج قاعدة ، وقد اشير الى ان مصدر المقاومة في اغلب السلالات هو البلازميد نفسه(Jia ,1992).

227- 2 – 10 تحييد البلازميدات Plasmids curing

228- يعرف التحييد بأنه عملية فقدان العزلات البكتيرية للبلازميد ويمكن ان يكون فقدان البلازميد ذاتياً Spontaneous من خلال فشل نسخة البلازميد في الانتقال الى الخلية الجديدة وعوامل فيزيائية Physical agents او بأستعمال عوامل كيميائية Chemical agent أو بأستعمال مستخلصات نباتية Plant extract . (Prescott *et al* ., 2005) ، كما ان لبعض المضادات الحيوية تأثيراً على ال DNA (Reuter & Sendel,1994) البلازميدي مما يسهل فقدان تلك البلازميدات كمضاد Rifampicin,Novobiocin (Johuston & Richmond,1970.)

229- إن آلية عمل هذه المواد في التخلص من البلازميد متعلقة بأحداث ضرر DNA في البلازميد الذي يؤدي بالتالي الى المنع من عملية تضاعفه الأعتيادي بدون التأثير على تضاعف الكروموسوم (Kalkarni & Kanekar,1998) ، وتشمل المواد الكيميائية مادة Acridine Orange ، وبروميد الأثيديوم ، والأكردين البرتقالي UREA ، واليوريا SDS وغيرها ، إن آلية التحييد بالأكردين البرتقالي تكون بتثبيط تضاعف Ethidium bromide وان استعمال التراكيز العالية منه تثبط تضاعف DNA البلازميد عن طريق تخلله بين قواعد الـ فأن استعمالها يؤدي الى فقدان كل او جزء الكروموسوم (Friefeder,1987) أما مادة SDS من العناصر الوراثية وبتكرار عالٍ.

المواد وطرائق العمل

3 ١- الاجهزة والمواد المستعملة

٣-١-١ الاجهزة المستعملة

الجهاز	الشركة المصنعة والمنشأ
حاضنة Incubater	Memmert (Germany)
فرن كهربائي Oven	Memmert (Germany)
حمام مائي Water bath	Memmert (Germany)
ماصات دقيقة بأحجام مختلفة Micropipettes	Brand (Germany)

Herolab(Germany)	UV-Transilluminator مصدر الأشعة فوق البنفسجية
Heraeus (Germany)	Microfuge جهاز نبذ مركزي صغير
Labcco (Germany)	Vortex دوارة
Gallenkamp (England)	Centrifuge جهاز نبذ مركزي
Gallenkamp (England)	Millipore filter المرشحات الدقيقة
Gallenkamp (England)	Distillatar جهاز التقطير
Gallenkamp(England)	Shaking water bath حمام مائي هزاز
Olympus (Japan)	Light microscope مجهر ضوئي
Hirayama (Japan)	Autoclave الموصدة
Mettler (Switzerland)	Sensitive balance ميزان حساس
Qean (Egypt)	Refrigerater ثلاجة
Radiometer (Denemark)	pH-meter مقياس الأس الهيدروجيني
Helena(USA)	Gel electrophoresis apparatus جهاز الترحيل الكهربائي

٣-١-٢ المواد الكيميائية والبايولوجية

المادة	الشركة المصنعة والمنشأ
Glycerol كليسيرول	BDH (England)
KH_2PO_4 فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين	BDH (England)
Na_2HPO_4 فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين	BDH (England)
فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين المائية $Na_2HPO_4.2H_2O$	BDH (England)
Starch النشأ	BDH (England)

BDH (England)	Iodine	اليود
BDH (England)	Potassium iodide	يوديد البوتاسيوم
BDH (England)	H_2SO_4	حامض الكبريتيك
BDH (England)	NaCl	كلوريد الصوديوم
BDH (England)	Ethanol	إيثانول
BDH (England)	Tris – base	ترس قاعدي
BDH (England)	Ethidium bromide	بروميد الأثيديوم
BDH (England)	Potassium phosphate	فوسفات البوتاسيوم
BDH (England)	Glucose	كلوكوز
Oxoid (England)	Hydrogen peroxide	بيروكسيد الهيدروجين
Oxoid (England)	Peptone	ببتون
Merck (Germany)	Urea	يوريا
Merck (Germany)	Boric acid	حامض البوريك
Fluka (Switzer land)	Yeast extract	خلاصة الخميرة
Fluka (Switzer land)		EDTA
Sigma (U.S.A)	Agarose	أكاروز
Difco (U.S.A)	Tryptone	تربتون
Sandox (Astralia)	Penicillin G	بنسلين جي

٣-١- الاوساط الزرعية 3

الشركة المجهزة والمنشأ	الوسط	
Himeda(India)	MacConkey agar	أكاركونكي
Himedia (India)	Blood base agar	أكارالدم الاساس
Himedia (India)	Pseudomonas isolation agar	أكار السيدوموناس
Himedia (India)	Urea agar base	أكار اليوريا الاساس

Himedia(India)	Simmon Citrate agar وسط سترات السايمون
Oxoid(England)	Nutrient agar أكار المغذي
Oxoid (England)	وسط MR/VP
Oxoid (England)	Muller-Hinton agar أكارمولرهنتون
Oxoid (England)	Nutrient broth وسط المرق المغذي
Oxoid (England)	Brain-heart infusion broth وسط نقيع القلب والدماغ
Merseyside (U.K)	Kligler's iron agar وسط كليغلر

٤-١ الكواشف والمحاليل3

الشركة المجهزة	اسم الكاشف / المحلول
Syrbio (S.A.R)	Gram stain Solution محاليل صبغة كرام
Himedia (India)	Kovac's Indole Reagent كاشف الاندول
B.B.H(England)	Methyl red كاشف احمر المثيل
Bio-Merieux (France)	Voges-Proskauer Vp1-Vp2 كاشف فوكس بروسكاور

٥-١ المضادات الحيوية 3

٣-١-٥-١ اقراص المضادات الحيوية المستخدمة واقطار منطقة التثبيط القياسية

)NCCLS,2002(

قطرمنطقة التثبيط (ملليمتر)						
حساسة S	متوسطة I	مقاومة R	المنشأ	تركيزالقرص µg/ml	الرمز	المضاد الحيوي
14	13-12	11	Ireland	10	Am	Ampicillin
14	13-12	11	Turkey	25	Amx	Amoxycillin
18	17-15	14	Turkey	30	CL	Cephalexin
≥17	16-14	≤13	Turkey	100	PY	Carbencillin
≥23	22-15	≤14	Turkey	30	CTX	Cefotaxime
≥21	20-14	≤13	Alrazi-Iraq	30	CTR	Cefriaxone
≥18	17-15	≤14	India	300	FT	Nitrofourantoin
≥17	16-15	≤14	Turkey	30	AK	Amikacin
≥17	16-13	≤12	Turkey	10	NOR	Norfloxacin
≥15	14-13	≤12	Alrazi-Iraq	10	TB	Tobramycin
≥15	14-13	≤12	Turkey	10	CN	Gentamicin
≥21	20-16	≤15	Turkey	5	CIP	Ciprofloxacin
≥18	17-15	≤14	Turkey	100	PRL	Piperacillin
≥18	17-15	≤14	Turkey	30	CAZ	Ceftazidime
≥16	15-11	≤10	Turkey	25	SXT	Co-trimoxazole
≥16	15-13	≤12	India	5	OF	Ofloxacin

٣-١-٥-٢ مساحيق المضادات الحيوية

المضاد	المنشأ
Ampicillin	معمل ادوية سامراء
Amoxicillin	معمل ادوية سامراء
Carbencillin	معمل ادوية سامراء
Cephalexin	معمل ادوية سامراء
Cefotaxime	معمل ادوية سامراء
Cftriaxone	معمل ادوية سامراء
Ciprofloxacin	دار الدواء / الاردن
Gentamicin	معمل ادوية سامراء / العراق
Piperacillin	Pharmachim/Italy
Amikacin	الشركة العربية لتصنيع الادوية/ الاردن
Ceftazidime	ELsaad pharma/aleppo-syria

3) المثبطات (Inhibitiors-١-٦

المثبط	المنشأ
حامض الكلافولينك Clavulanic acid	مركز ابحاث الرازي / العراق
ببراسيلين / تازوبكتام Tazocin	Wyeth lederle S.P.A / Catania (Italy)
أمبسلين / سلباكتام Sulba	الفا– حلب للصناعات الدوائية حلب – سورية

3السلالات القياسية -١-٧

السلالة	المصدر
Pseudomonas aeruginosa ATCC154427	قسم علوم الحياة – كلية العلوم – الجامعة المستنصرية
E.coli ATCC10536ó	قسم علوم الحياة – كلية العلوم – الجامعة المستنصرية

3 مواد متفرقة ٨-١-

api 20NE Kit ١-٨-١-٣ عدة التشخيص

وتضم مجموعة من الفحوصات الكيموحيوية المبينة (Bio Meriux (France مجهزة من الشركة في الملحق (٢).

Plasmid Extraction ٢-٨-١-٣ عدة عزل الدنا البلازميدي

Promega (USA). مجهزة من الشركة

مصدر الدم 33-١-٨-

( ) مجهز من مصرف الدم/ ديالى AB دم بشري صنف .

٣-٢ طرائق العمل

٣-٢-١ تحضير المحاليل والكواشف

حضر عدد من المحاليل والكواشف والصبغات المستخدمة في الدراسة ، عقمت تلك التي تحتاج الى تعقيم باستخدام جهاز الموصدة (Autoclave عند درجة حرارة 121م° لمدة 15 دقيقة) بينما عقمت بقية المواد الاخرى التي تتعرض للتلف بدرجات الحرارة 15وبضغط (باوند/ انج^{٢}) ، المرتفعة مثل اليوريا والمضادات الحيوية بالترشيح بمرشحات دقيقة Milliporefilter بقطر 0.22 مايكروميتر ، أما المواد الزجاجية فقد عقمت بالفرن عند درجة حرارة 180م° لمدة ساعتين .

٣-٢-١-١ المحلول الملحي الفسلجي Normal Saline

وذلك لاستعماله (Forbes *et al*.,2002 حسب ما جاء في حضر المحلول الملحي الفسلجي) في اجراء التخافيف بإذابة 0.85غم من كلوريد الصوديوم في 90 مل ماء مقطر ثم اكمل الحجم الى 100مل . عقم بالموصدة ، وحفظ بدرجة حرارة 4م° لحين الاستعمال .

٣-٢-١-٢ محلول ثابت العكورة القياسي Macfarland Standard

حضر المحلول وفق ما جاء في (Bauer *et al*.,1996-) كما يلي:

1.175غم من كلوريد الباريوم في 90 مل من الماء المقطر، واكمل الحجم الى 100 مل. (محلول-أ- اذيب

1 مل من الحامض 1) باضافة H_2SO_4% من حامض الكبريتيك المركز (محلول – ب- حضر 100 مل. 90 مل من الماء المقطر المعقم ثم أكمل الحجم الى 90مل محلول (ب) رُج المحلول بقوة ووضع في أنابيب 99.5 مل من محلول (أ) الى 0.5 مل أضيف زجاجية محكمة الغطاء لمنع التبخر وحفظت في الظلام لحين الاستعمال . تمزج محتويات الأنبوبة جيداً قبل كل إستخدام .

٣-٢-١-٣ محاليل المضادات الحيوية

حضرت محاليل خزينة (Stock solutions بتركيز نهائي مقداره 10 ملغم/مل حسب ما ورد في (NCCLS , 2002 -) لكل من المضادات الاتية:

Carbencillin , Cephalexin , Amoxicillin , Ampicillin , Gentamicin, Ciprofloxacin , Piperacillin , Cefotaxime , Ceftazidime ,Ceftriaxone Amikacin.

مل ، عقمت 100مل من الماء المقطر ثم أكمل الحجم الى 90 غم من المضاد في 1بإذابة مايكروميتر وحفظت في 0.22هذه المحاليل بالترشيح بوساطة مرشحات دقيقة ذات ثقوب بقطر الثلاجة لحين الاستخدام .

٣-٢-١-٤ محاليل الكشف عن أنزيم البيتالاكتاميز

حضرت محاليل الكشف عن أنزيم البيتالاكتاميز بطريقة اليود السريعة Rapid Iodometric Method)) والمحاليل هي : WHO,1978 وذلك حسب ما ورد في

٣-٢-١-٤-١ محلول النشأ Starch Solution

غم من مادة النشأ في ١٠ مل من الماء المقطر، نقلت 0.1 حضر آنياً عند الاستعمال باذابة دقائق وذلك للتأكد من ذوبان النشأ ، حفظ 10 لمدة °م100القنينة الى حمام مائي بدرجة حرارة م°.4 المحلول في درجة

٣-٢-١-٤-٢ محلول اليود Iodine Solution

مل من الماء المقطر 90 غم من يوديد البوتاسيوم في 5.32 غم من اليود و2.03حضر بإذابة م°.4 مل وحفظ المحلول في قنينة معتمة ومعقمة بدرجة 100 بعدها اكمل الحجم الى

٣-٢-١-٤-٣ محلول البنسلين جي (Penicillin G Solution)

حضر بإذابة البنسلين جي في دارئ الفوسفات المتكون من محلولين هما:-

في كمية K_2HPO_4) غم من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين 0.907المحلول (أ):- اذيب ( ) مل100من الماء المقطر ، اكمل بعدها الحجم الى (.

، و Na_2HPO_4) غم من فوسفات الصوديوم احادية الهيدروجين 0.946المحلول (ب):- اذيب (في كمية من $Na_2HPO_4.2H_2O$) غم من فوسفات الصوديوم احادية الهيدروجين (المائية) 1.19( ) مل من 87.6) مل ، بعد ذلك أُخذ (100الماء المقطر ، أكمل بعدها الحجم بالماء المقطر الى ( ) بعد 6.0) مل من محلول (ب) خلطا معاً وضبط الرقم الهيدروجيني الى (12.4محلول (أ) و ( )

) ، عقم بالترشيح Penicilin G) غم من بنسلين جي (0.5693تحضير هذا الدارئ ذوب فيه (
م°) لحين الاستعمال .20-ووزع في عبوات صغيرة وحفظ عند درجة حرارة (

٣-٢-١-٥ محاليل عزل الدنا البلازميدي

Promega (U.S.A)أستخدمت محاليل عزل الدنا البلازميدي المجهزة من قبل الشركة

وتضم المحاليل التالية :

1. Cell lysis buffer (CLC).
2. Neutralization Solution (NSC).
3. Endotoxin Removel Wash (ERB).
4. Column Wash Solution (CWC).
5. Elution Buffer (EBB).

Kit name : Pure Yield^{TM} Plasmid Miniprep System .

٣-٢-١-٦ محاليل الترحيل الكهربائي Gel Electrophoresis Solutions

وكما يأتي) Maniatis *et al* حضرت محاليل الترحيل الكهربائي وحسب ما ورد في (١٩٨٢,.
:

❖ **دارئ الترس بوريت TBE**

) مولار من 0.089) ، (Tris - base) مولار ترس قاعدي (0.089حضر بتركيز نهائي (
اكمل الحجم الى ١ لتر من ،EDTA) مولار من مادة 0.002) و (Boric acidحامض البوريك (
) وعقم بالموصدة .8الماء المقطر، ضبط الاس الهيدروجيني الى (

❖ **صبغة بروميد الاثيديوم Ethidium Bromide**

) ملغم من صبغة بروميد الاثيديوم في 5) ملغم/مل ، بإذابة (5حضر محلول خزين تركيزه (
) مل من الماء المقطر المعقم ، وخفف عند الاستعمال للحصول على تركيز نهائي مقداره 1(
%) مكغم/مل . 0.5(

❖ **دارئ التحميل Loading Buffer**

%) صبغة 25 .0ماء مقطر ، (%)20، (%TBE)50%) كليسيرول ، (30 حضر من (
. بروموفينول الازرق

٣٧-٢-١- كاشف أنزيم الكاتاليز Catalase Reagent

حضر من خلط (1 مل من الماء 9%) مع (30) مل من بيروكسيد الهيدروجين المركز (3% بيروكسيد الهيدروجين، وحفظ في الثلاجة في عبوة داكنة ، المقطر للحصول على تركيز 3%). استعمل للكشف عن قابلية العزلات البكتيرية قيد الدراسة على انتاج انزيم الكاتاليز (Collee *et al*., 1996).

٣٨-٢-١- كاشف الاوكسيديز Oxidase Reagent

حضر انياً بإذابة (1 غم من رباعي المثيل بارافنيلين ثنائي الامين هيدركلوريكك (Tetramethyl-P-phenylen diamindihydrochlorid) في 90 مل من الماء المقطر المعقم ومن ثم أكمل الحجم الى (100 مل ، أستخدم هذا الكاشف للكشف عن انتاج انزيم الاوكسيديز من قبل البكتريا (Koneman *et al*.,1992).

٣-٢-٢ الاوساط الزرعية Culture Media

حضرت الاوساط الزرعية حسب تعليمات الشركة المصنعة والمثبتة على العبوات وضبط الاس الهيدروجني الى (7) ثم عقمت بالموصدة (Autoclave) بدرجة حرارة (121 م°) وضغط 15 باوند/ انج^{2}) لمدة 15 دقيقة ، ومن ثم حضنت الاطباق عند درجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة للتأكد من عدم تلوثها بعدها حفظت في الثلاجة عند حرارة 4 م° لحين الاستعمال.

وهذه الاوساط هي :

- وسط أكارماكونكي MacConkey
- وسط أكار المغذي Nutrient agar
- وسط أكارمولرهنتون Muller- Hinton agar
- وسط المرق المغذي Nutrient broth
- وسط نقيع الدماغ والقلب Brain –heart infusion broth
- وسط أكار الستريت Simmon citrate agar

(حضر بشكل مائل بعد صبه في أنابيب وتعقيمه بالموصدة).

- وسط كليغلر Kligler's Iron agar

(حضر بشكل مائل بعد صبه في أنابيب وتعقيمه بالموصدة).

٣-٢-٢-١ وسط أكار الدمBlood base agar

حضرت قاعدة الدم الاساس حسب التعليمات المذكورة على العبوة وعقمت بالموصدة، بعدها % ، ومزج جيداً بعدها 5 بنسبة ABم° ثم اضيف صنف الدم 45-50 تركت لتبرد بدرجة حرارة م° لحين 4 ، حفظ بدرجة صب الوسط في اطباق معقمة ، وترك ليتصلب بدرجة حرارة الغرفة الحال لكريات الدم Hemolysin، أستخدم للعزل الاولي للبكتريا المنتجة لأنزيم الاستعمال الحمر .

٣-٢-٢-٢ وسط مرق لوريا Lauria Broth

غم من التربتون 10 مل من الماء المقطر وهي 950حضر الوسط بإذابة مكوناته في وعدل NaCl غم من 10) و Yeast Extract غم من مستخلص الخميرة (5) و Tryptone(Sambrook *et* لتر بالماء المقطر وعقم بالموصدة (1، ثم اكمل الى 7الرقم الهيدروجيني الى *al*.,1989.(

٣-٢-٢-٣ وسط أكار اليوريا Urea base Agar

حسب التعليمات Urea Base agar مل من وسط اكار اليوريا الاساس 950حضر مل من 50م° اضيف اليه 45 الواردة من الشركة المصنعة وبعد تعقيمه بالموصدة وتبريده الى) ، ثم Millipore Filter% يوريا معقمة بالترشيح باستخدام اغشية الترشيح الدقيقة (40محلول صب بصورة مائلة في أنابيب معقمة ذات اغطية محكمة ، أستخدم الوسط لغرض الكشف عن).Li *et al* .,2004قابلية العزلات على إنتاج انزيم اليوريز (

٣-٢-٢-٤ وسط ماء الببتونPepton water

مل من الماء 100 غم من كلوريد الصوديوم في 0.5) غم من الببتون و 2 حضر بإذابة (، أستخدم هذا الوسط في 7المقطر المعقم ، عقم بالموصدة بعد ضبط الاس الهيدروجيني الى).Koneman *et al*.,1992التحري عن إنتاج الاندول (

٣-٢-٢-٥ وسط المثيل الاحمر – فوكس بروسكاور السائلMR-VP Broth

مل من الماء 100 غم من فوسفات البوتاسيوم في 5 غم من الببتون و 0.5 حضر بإذابة مل للانبوبة ، بعد التبريد أضيف 5المقطر عقم بالموصدة بعد توزيعه في أنابيب اختبار بواقع اليه ١٠٪ من محلول سكر الكلوكوز المعقم بالترشيح بحيث أصبح التركيز النهائي للكلوكوز في الوسط ٠.٥٪ وأستخدم في اختبار احمر المثيل- فوكس بروسكاور (Harley & Prescott,1996.(

٣-٢-٢-٦ وسط أكار السيدوموناس *Pseudomonas* isolation agar

غم من الوسط في ١٠٠٠ مل من الماء المقطرالحاوي على ٢٠ مل 45.3 حضر بإذابة فيعد وسطاً *Pseudomonas*كليسيرول وعقم بالموصدة أستخدم هذا الوسط في تنمية عزلات انتقائياًSelective media) (Baron&Finegold ,1990.

٣-٢-٢-٧ وسط أكار الحليب الخالي من الدهن skim milk Agar medium

مل من الماء المقطر وعقم بالموصدة وبعد ان عقم 87.5 حضر بإذابة الاكار المغذي في مل من الحليب المعقم الخالي من الدسم بظروف معقمة 12.5م°، اضيف اليه 50وبرد الى ومزج جيداً ثم صب في أطباق وحفظ لحين الاستعمال ، أستخدم هذا الوسط للتحري عن إنتاج أنزيم البروتييز للعزلات البكتيرية قيد الدراسة Cruickshant *et*) *al*.,1975.(

٣-٢-٢-٨ وسط أكار البيض Egg Yolk agar

حضر محلياً بإضافة صفار البيض الطازج الى وسط المغذي الصلب المعقم والمبرد الى % ومزج جيداً ثم صب في أطباق وحفظ لحين الاستعمال 15م° وبنسبة)45-50درجة حرارة (أستخدم هذا الوسط للتحري عن انتاج انزيم الليسيثينيز للعزلات البكتيرية قيد الدراسة Cruickshant *et al*.,1975 .(

٣-٢-٣ جمع العينات Collection of Samples

جمعت 304 عينة تحت الاشراف الطبي المختص من حالات مرضية مختلفة وتضمنت 79 عينة من مسحات الجروح ، و51 عينة من مسحات الحروق ، و 47 عينة من مسحات الاذن، و 127 عينة من عينات الادرار، بإستعمال Disposable Cotton Swabs و قناني بلاستيكية معقمة لجمع عينات الادرارالوسطي ، تم جمع العينات من مستشفى بعقوبة التعليمي ، ولغاية ومستشفى البتول للولادة والاطفال ، والعيادة الاستشارية في الفترة بين ٢٠١٠/٩/١ ٢٠١١/١/١٦ إذ سجلت المعلومات المتعلقة بالمريض من المصدر والعمر والجنس وأمراض اخرى في استمارة خاصة (ملحق ١)، زرعت النماذج مباشرة بعد أخذ العينة لغرض التشخيص.

٣-٢-٤ زرع العينات Samples culture

زرعت العينات (مسحات الحروق ، ومسحات الجروح ، ومسحات الاذن، والادرار) بشكل فوري على وسط اكار الدم ووسط ماكونكي ، وتم تنقية العزلات على وسط *Pseudomonas* agar بطريقة التخطيط على هذه الاوساط وحضنت كافة الاطباق هوائياً بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة المعنية للبكتريا والكيموحيوية والمورفولوجية التشخيصية الفحوصات من عدد بعدها بحث ، أجري بالدراسة.

٣-٢-٥ حفظ وإدامة العزلات البكتيرية

حفظت العزلات البكتيرية بعد تشخيصها على أوساط زرعية مائلة من الاكار المغذي Slant وأستمرت عملية الادامة بشكل دوري شهرياً من خلال تجديد زراعتها وذلك بنقل 4 في درجة م° مستعمرة واحدة الى مائل أكار مغذي جديد لضمان بقائها نشطة طيلة فترة الدراسة.

لحفظ العزلات مدة طويلة ، 15أستخدم وسط نقيع الدماغ والقلب المضاف اليه كليسيرول بنسبة % لحين الاستعمال.20- وتم حفظها في درجة م°

٣-٢-٦ تشخيص العزلات البكتيرية

٣-٢-٦-١ الفحوصات المظهرية

) إذ شخصت Holt *et al*.,1994شخصت العزلات البكتيرية اعتماداً على ما ورد في (المستعمرات مبدئياً اعتماداً على الصفات المظهرية وتضمنت شكل المستعمرات، ولونها، وقوامها، ورائحتها، وحجمها على وسط أكار الماكونكي وأكار الدم ، أخضعت العزلات الى الفحص المجهري بإستخدام صبغة كرام للتعرف على شكل البكتريا وترتيبها وتفاعلها مع ملون كرام .

٣-٢-٦-٢ الفحوصات الكيموحيوية

٣-٢-٦-٢-١ إختبار أنزيم الكاتاليز Catalase test

استخدم هذا الاختبار للكشف عن قدرة البكتريا على إنتاج أنزيم الكاتاليز الذي يحلل بيروكسيد الهيدروجين الى ماء ويتحرر غاز الاوكسجين بشكل فقاعات هوائية ، إذ نقل جزء من المزروع البكتيري الى شريحة زجاجية نظيفة وأضيف اليها بضع قطرات من 3% كاشف بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) بإستخدام ماصة باستور، يعد ظهور فقاعات غاز الاوكسجين دليل على ايجابية الفحص (Koneman *et al*.,1992.)

٣-٢-٦-٢-٢ إختبار أنزيم الاوكسيديز Oxidase test

استخدم هذا الاختبار للكشف عن قدرة البكتريا على إنتاج أنزيم السيتوكروم اوكسيديز (Cytochrome oxidase) ، إذ شبعت ورقة ترشيح بقطرات من كاشف الاوكسيديز، وبوساطة أعواد خشبية معقمة نقلت مستعمرة من العزلة قيد الدراسة الى ورقة الترشيح ، تعد النتيجة موجبة عند ظهور اللون البنفسجي خلال (١٠) ثوانٍ من ملامسة الخلايا البكتيرية لكاشف الاوكسيديز على الورقة (Koneman *et al*.,1992.)

٣-٢-٦-٢-٣ إختبار الاندول Indole test

استخدم للكشف عن وجود الاندول ، الذي يعد أحد نواتج أيض الحامض الاميني التربتوفان ، إذ لقح وسط ماء الببتون السائل Tryptophanase نتيجةً لامتلاك البكتريا لانزيم التربتوفانيز بمزروع العزلة قيد الدراسة ، ثم أضيف 24 م° لمدة 37 قطرات 5 ساعة ، حضن الوسط بدرجة على السطح الداخلي لانبوبة الاختبار، تعد النتيجة Kovac's reagentمن كاشف كوفاكس موجبة عند ظهور حلقة حمراء خلال ثوان من إضافة الكاشف (Koneman *et al*.,1992.)

٣-٢-٦-٢-٤ إختبار احمر المثيل Methyl red test

استخدم هذا الاختبار للكشف عن قدرة البكتريا على إنتاج كميات كبيرة من احماض اللاكتيك بمزروع للعزلة قيد MR/VP نتيجة أيض الكلوكوز، إذ لقح مرق Formic أو الفورميك Lactic ، ثم أضيفت خمس قطرات من كاشف احمر ساعة48-72م° لمدة 37 الدراسة ، حضن بدرجة)Koneman *et al*.,1992.المثيل ، تعد النتيجة موجبة عند تغيير اللون الى احمر (

٣-٢-٦-٢-٥ اختبار فوكس بروسكاور Voges –Proskaur test

استخدم هذا الاختبار للكشف عن قدرة البكتريا على إنتاج استيل مثيل كاربينو (اسيتون) -72م° لمدة 37 بمزروع العزلة قيد الدراسة ، حضن بدرجة حرارة MR/VP إذ لقح مرق Aceton ساعة48 .

) مل من محلول الفانفثول 0.6) مل من العالق الى أنبوبة إختبار نظيفة ، أضيف اليها (1نقل ( ) مع رج Vp2كاشف (40%) مل من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم 0.2 متبوعاً (Vp1)(كاشف Koneman دقيقة (15الانبوبة بلطف ، تعد النتيجة موجبة عند ظهور اللون الاحمر بعد حوالي *et al*.,1992.(

٣-٢-٦-٢-٦ إختبار استهلاك السترات Citrate Utilization test

ساعة24م° لمدة 37 ، حضن بدرجة حرارة زرعت العزلات على مائل وسط سايمون- ستريت عند تحول لون الوسط من الاخضر الى الازرق لاستهلاك السترات . ، تعد النتيجة موجبة

٣-٢-٦-٣ التشخيص بنظام Api-20NE

بعد الحصول على نتائج الفحوصات التشخيصية للعزلات قيد الدراسة ، أستخدمت عدة للتشخيص التأكيدي الذي يعتمد على السرعة والدقة ، إذ يتألف الشريط Api 20NEالتشخيص الواحد من (٢٠) أنبوبة صغيرة تحتوي كل منها على المادة الأساس لإختبار كيموحيوي معين .

حضر عالق من المزروع البكتيري مع (٢) مل من المحلول الفسيولوجي المعقم الى أن تصبح إلى NO3كثافة المحلول بمقدار كثافة أنبوبة ماكفرلاند القياسية (٠.٥) ، لُقحت الإختبارات من بتوزيع عالق المحلول داخل الأنابيب ، وليست الكؤوس بإستخدام نفس الماصة ، ثم أضيفPNPG (٧) مل Auxomedium(٢٠٠) مايكروليتر من العالق البكتيري المحضر إلى وسط زرعي خاص بهذا العالق ، ثم PAC إلى GLUومُزج جيداً للمجانسة ، ملأت الأنابيب والكؤوس للإختبارات من لغرض توفير ظروف GLU ، ADH ، UREأضيف زيت معدني إلى كؤوس الإختبارات الثلاثة

لاهوائية ويتم توفير الرطوبة بإضافة كمية قليلة من الماء إلى قاعدة العلبة ، حضنت الأشرطة في (٣٧) م° لمدة (٢٤) ساعة وأضيف بعدها الكواشف حسب متطلبات كل إختبار ، دونت النتائج لتشخيص النماذج من جنس ونوع حسب Api 20NE analytic profile indexوفسرت بوساطة تعليمات الشركة المصنعة ملحق (٢) .

٣-٢-٧ التحري عن بعض عوامل الضراوة في بكتريا الزوائف الزنجارية Detect of Virulance Factors of *Pseudomonas aeruginosa*

3-٢-7-1 التحري عن أنزيم الليسيثينيز Lecithenase Production test

تم التحري عن إنتاج انزيم الليسيثينيز بإستخدام وسط صفار البيض Egg Yolk agar ، إذ 24-48م° لمدة 37 أخذت مستعمرات نقية ولقح الوسط بها ، وحضنت الاطباق في درجة حرارة ، تكون مناطق رائقة حول المستعمرات النامية دلالة على إنتاج أنزيم الليسيثينيز ساعة (Cruickshank *et al* ., 1975.)

٢-٣٧-2 التحري عن إنتاج الهيمولايسين Haemolysin Production

تم الكشف عن قابلية العزلات البكتيرية قيد الدراسة على إنتاج الهيمولايسين البكتيري بزرع هذه العزلات على وسط اكار الدم ، حضنت الاطباق بعد التلقيح في درجة حرارة 37م° ولمدة 24ساعة . وشوهدت مناطق التحلل متمثلة بمناطق شفافة تحيط بمستعمرات البكتريا المنتجة للهيمولايسين (Atlas *et al*.,1995.)

٢-٣٧-٣ التحري عن أنزيم البروتييز Protease Production test

بالمستعمرات البكتيرية ، إذ تم عمل حفر دائرية منتظمة Skimmed milk agarلقح وسط م° لمدة 137) في هذه الحفر، وحضنت الاطباق بدرجة 1-(فقرة ٣-٢-٩- وحقن العالق البكتيري ساعة24 ظهور هالة شفافة حول الحفر دليل النتيجة الموجبة للاختبار(،Benson,2002(.

3-٢-7-4 اختبار قابلية العزلات على الالتصاق بالخلايا الطلائية Adhesion Uro Epithelial Cells

أتبعت طريقة (Iwahi *et al.*,1983) لمعرفة قابلية العزلات على الالتصاق بالخلايا الطلائية .

٤-١ تحضير الخلايا الطلائية ٣٧-٢-

تم الحصول على الخلايا الطلائية من راسب عينات إدرار إناث غير مصابات باخماج المجاري البولية ، إذ غسلت الخلايا بعد ترسيبها بالمحلول الملحي الفسلجي أربع مرات بإعادة النبذ المركزي دورة / دقيقة ثم أعيد تعليق الخلايا بالمحلول 1500-2000في كل مرة لمدة خمس دقائق بسرعة الفسلجي .

٤-٢ إختبار الالتصاق بالخلايا الطلائية الظهارية ٣٧-٢-

- أخذ 0.5 مليلتر من مزروع بكتيري بعمر 24 ساعة وأضيف اليه 0.5 مليلتر من عالق الخلايا الطلائية المحضر في الفقرة (٣-٢-7-4-١).
- مزج الخليط جيداً ثم حضن بدرجة حرارة 37م° لمدة ساعة واحدة مع التحريك كل عشر دقائق .
- غسلت الخلايا لاربع مرات بالمحلول الملحي الفسلجي مع النبذ المركزي لمدة 5 دقائق بسرعة 1500-2000 دورة بالدقيقة لكل مرة للتخلص من البكتريا غير الملتصقة .
- أخذت قطرة من العالق النهائي على شريحة زجاجية وتركت لتجف بدرجة حرارة الغرفة ثم ثبتت بحرارة اللهب وصبغت الشريحة بصبغة كرام .
- لوحظت نتائج الالتصاق تحت المجهر الضوئي بإستخدام العدسة الزيتية إذ تظهر النتيجة الموجبة بالتصاق البكتريا بشكل مفرد أو تجمعات على سطح الخلايا الطلائية.

أستخدم الملح الفسلجي مع الخلايا الطلائية من دون عالق بكتيري كفحص سيطرة سالبة .

٥-test Hemagglutination اختبار تلزين كريات الدم الحمراء ٣٧-٢-

أتبعت طريقة (Iwahi *et al.*,1983) للكشف عن قابلية العزلات قيد الدراسة على تلزين كريات الدم الحمراء .

٥-١ تحضير خلايا الدم الحمراء للانسان٣٧-٢-

الذي تم الحصول عليه في عبوات بلاستيكية معقمة ، أجريت AB استخدم الدم البشري صنف دقائق بإستخدام أنابيب نبذ 5 دورة / دقيقة ولمدة 1500-2000عملية النبذ المركزي للدم بسرعة مركزي بلاستيكية معقمة للتخلص من البلازما والحصول على راسب كريات الدم الحمراء ، غسلت الخلايا بالمحلول الملحي الفسلجي أربع مرات حيث يتم نبذ العالق بالسرعة نفسها والوقت السابقين في كل مرة ليصبح عالق الدم جاهز لاجراء الاختبار .

٢-٥- اختبار تلازن خلايا الدم الحمراء ٣٧-٢-

) لاجراء الفحص، إذ مزجت قطرة Slide agglutination استخدمت طريقة التلازن بالشريحة (ساعة مع قطرة من كريات الدم الحمر المحضرة في 24) مليلتر من العالق البكتيري بعمر 0.05(أعلاه بعدها مزجت القطرتان بإستخدام عيدان خشبية معقمة ولمدة دقيقيتين ، شوهدت بعدها نتائج التلازن بإستخدام المجهز الضوئي ، اجريت تجربة سيطرة مع كل عزلة بمزج قطرة من كريات الدم الحمر مع قطرة من المحلول الملحي الفسلجي على شريحة زجاجية نظيفة .

٦-Urease test التحري عن أنزيم اليوريز ٣٧-٢-

ساعة ، ان 24-48 م° لمدة 37 لقح وسط اليوريا بالمزروع البكتيري ثم حضن بدرجة حرارة تحول لون الوسط الى اللون الوردي دليل على إيجابية الاختبار.

٨-٢-٣Antibiotic suscepitibility فحص الحساسية للمضادات الحيوية test

القياسية لاختبار حساسية البكتريا للمضادات الحيوية Bauer & Kerby أستخدمت طريقة)Vandepitte *et al.*,1991 : وكالاتي (

- لقح 5 مل من وسط المرق المغذي بـ ٢-٣ مستعمرات من مزارع بكتيرية نقية بعمر 24 ساعة .
- رجت الانابيب جيداً ، وحضنت بالحاضنة بدرجة 37م° لمدة 24 ساعة .
- قورنت عكورة النمو بعكورة المحلول ثابت العكرة القياسي لاعطاء عدد تقريبي مساوي 1.5× 10^8خلية / مل.
- نقل 0.1 مل من العالق البكتيري ونشر على وسط اكار مولر هنتون، ترك الطبق لمدة ٥ دقائق بدرجة حرارة الغرفة لحين جفاف المزروع .

- نقلت اقراص المضادات الحيوية الى سطح الوسط الزرعي بوساطة ملقط معقم بمعدل 6-7 اقراص لكل طبق .
- حضنت الاطباق بدرجة 37 م° لمدة 18-24 ساعة قيست بعدها اقطار مناطق التثبيط حول كل قرص ، عدت البكتيريا حساسة (S) او مقاومة (R) اومتوسطة intermediate(I) حسب المواصفات القياسية الواردة في NCCLS (2002).

٣-٢-٩ التحري عن إنتاج أنزيم البيتالاكتاميز β-Lactamase Production

٣-٢-٩-١ الفحص الاولي الخاص بانتقاء العزلات المقاومة لمضادات البيتالاكتام

أجري فحص أولي للتحري عن البكتريا المقاومة لمضادات البيتالاكتام ، وأختيرت مضادات الامينوبنسلين لتمثل المجموعة وكما يأتي:

٣-٢-٩-١-١ تحضير العالق البكتيري

لقحت أنابيب إختبار تحوي كل منها على (5 مل من محلول الملح الفسلجي بـ (150 ساعة للعزلات قيد الدراسة ، مزجت بمازج وبذلك تم تحضير عالق بكتيري بتركيز تقريبي للخلايا (10^8 خلية/مل) مايكروليتر من مزارع بكتيرية منماة في وسط نقيع الدماغ والقلب بعمر (18 وذلك بعد مقارنة عكرة النمو المتكونة مع عكرة محلول ثابت العكرة القياسي المحضر حسب الفقرة (٣-٢-١-٢) وإجراء العدد الحي للخلايا في المحلول .

٣-٢-٩-١-٢ تلقيح الاوساط الزرعية

حضر وسط أكار مولر هنتون وعقم بالموصدة ثم برد الى (45-50 م° أضيف مضاد الأمبسلين بتركيز نهائي مقداره (100 مكغم/مل ، رجت الاوساط جيداً وصبت في أطباق معقمة بطريقة البقع حيث (4 لكل بقعة (10 خلية / مل من العالق البكتيري المحضر وفق الفقرة (10^5-٣) مايكرولتر وحضنت الاطباق في درجة حرارة (29-37 م° لمدة ١-٣) ساعة . 24) لكل عزلة قيد الدراسة وحضنت الاطباق في درجة حرارة (

٣-٢-٩-٢ إستخدام طريقة اليود القياسية السريعة للكشف عن أنزيم البيتالاكتاميز

استخدمت هذه الطريقة للكشف عن قابلية العزلات قيد الدراسة على إنتاج أنزيم البيتالاكتاميز) ، وكما يأتي : 1978(WHOوذلك حسب ما ورد في

١. حضرت مزارع للعزلات البكتيرية بعمر 24 ساعة .
٢. نقلت المستعمرات البكتيرية بوساطة العروة الى أنابيب صغيرة حاوية على (100) مايكروليتر من البنسلين جي (فقرة ٣-٢-١-٤-٣) ، حضنت الانابيب لمدة 30 دقيقة عند درجة حرارة 37 م° ، ثم أضيف الى كل انبوبة 50 مايكروليتر من محلول النشأ (فقرة ٣-٢-١-٤-١) ومزجت جيداً .
٣. اضيف الى كل انبوبة في اعلاه (20) مايكروليتر من محلول اليود (فقرة ٣-٢-١-٤-٢) ، إذ يتحول لون المحلول الى أزرق غامق نتيجة تفاعل اليود مع النشأ ، مزجت محتويات الانابيب جيداً لمدة دقيقة واحدة.
٤. أحتسبت النتيجة موجبة عند حصول تغير لوني سريع من اللون الازرق الى اللون الابيض خلال دقيقة واحدة فقط من إضافة الكاشف (اليود) ، أعيد الفحص بظهور نتيجة موجبة متأخرة (أكثر من خمس دقائق) قورنت النتائج مع السيطرة االسالبة المتمثلة بالسلالة القياسية *P.aeruginosa* ATCC154427 والسيطرة الموجبة المتمثلة بالسلالة *E.coli* ATCC10536 .

٣-٢-١٠ التحري عن أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف (ESBLs)

للتحري عن أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف وذلك حسب ما جاء في (Jarlier, *et al.*,1988) وكالاتي : أستخدمت طريقة الاقراص المتاخمة Disc approximation

١. حضر العالق البكتيري للعزلات قيد الدراسة وفق الفقرة (٣-٢-9-١-١)، ونشر المزروع بوساطة المسحة القطنية Swab المعقمة على اطباق حاوية على وسط مولر هنتون بصورة كاملة ، تركت الاطباق لمدة 10 دقائق لتجف.
٢. وضع قرص يحتوي على خليط من Amoxicillin/ClavulanicAcid (30µg/Disc) في وسط الطبق الزرعي الملقح ، بعد ذلك رتبت أقراص المضادات الحيوية Piperacillin ,وCeftazidime وCefotaxime , على بعد 3 سم من مركز قرص خليط المضاد / المثبط .
٣. حضنت الاطباق عند درجة حرارة 37 م° ولمدة 18-24 ساعة .

٤. بعد ملاحظة مناطق التثبيط فأن حدوث إتساع في منطقة التثبيط بين القرص المركزي وواحد أو اكثر من الاقراص المذكورة دليل على النتيجة الموجبة أي إنتاج العزلة للانزيم .

٣-٢-١١ قياس التركيز المثبط الادنى Minimal - Inhibitory Concentration

٣-٢-١١-١ قياس التركيز المثبط الادنى بدون مثبطات أنزيمات البيتالاكتاميز

لحساب التركيز المثبط الادنى لعدد من المضادات الحياتية اعتماداً على ما ورد في Stock & Ridgway(1987) وكما يلي : استخدمت طريقة التخافيف المضاعفة المتسلسلة Two Fold Dilution Method

- حضرت تراكيز متسلسة متضاعفة تراوحت بين 0.5-1024 مايكروغرام/ مل لكل من المضادات الحيوية :

Ceftriaxone , Carbencillin , Cephalexin , Amoxicillin , Ampicillin , Gentamicin , Ciprofloxacin , Piperacillin , Ceftazidime , Cefotaxime , Amikacin

بإضافة نسب مختلفة من هذه المضادات من محاليلها الخزينة (الفقرة ٣-٢-١-٣) الى وسط أكار مولر- هنتون المعقم والمبرد الى 45. م°

- حضرت التخافيف العشرية وأختير التخفيف (10^{-2}) لمزارع البكتريا بعمر 24 ساعة بإستعمال المحلول المحلي الفسلجي المعقم .
- سحب 5 مايكروليتر من التخفيف اعلاه بوساطة ماصة دقيقة كلا على حدة ، ولقحت كقطرة واحدة على أوساط المضادات.
- كررت العملية للمزارع كافة بالتسلسل مكررين للتركيز الواحد، وتركت الاطباق لفترة في درجة حرارة الغرفة لحين جفاف القطرات قبل قلب الاطباق ، حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37م° لمدة 24 ساعة .
- احتسب التركيز المثبط الادنى بأنه اقل تركيز يمنع ظهور النمو البكتيري بعد حضانة 24-18 ساعة بدرجة حرارة 37 م°.

ويمثل اقل تركيز يمكن ان يصله المضاد في Break point تم مقارنة النتائج مع نقطة التوقف المصل ليعطي اعلى فعالية وبعده يصبح مقاوماً.

٣-٢-١١-٢ قياس التركيز المثبط الادنى مع مثبطات أنزيمات البيتالاكتاميز

تم قياس التركيز المثبط الادنى ودراسة فعالية إرجاع مثبطات أنزيمات البيتالاكتاميز للمضادات سيما مضادات البيتالاكتاميز وهي (Amoxicillin, Ampicillin , Ceftazidime , Ceftriaxone , Cefotaxime , Carbencillin , Cephalexin , Piperacillin(إذ ، أتبعت طريقة (Farrell *et al* ., 2003; Oliver *et al*., 1999) بمزج المضادات مع مثبط لكل من المضادات آنفة الذكر باستثناء الاموكزاسلين أستخدمت 4:1 بنسبة Clavulanic acid المثبط الى المضاد ، أما بالنسبة لمثبط 2:1) بنسبة خلط Augmentin التوليفة التجارية ( ) فقد أستخدم الخليط مع مضاد الببراسلين وهو مجهز من قبل الشركة Tazobactam التازوباكتام (2:1) المخلوط مع مضاد الامبسيلين وبنسبة Sulbactam وكذلك السلباكتام (8:1 المصنعة وبنسبة ١-)١.فهو مجهز من قبل الشركة المصنعة ، وأتبعت طريقة العمل المذكورة بالفقرة (٣-٢-

٣-٢-١٢ إستخلاص الدنا البلازميدي Extraction DNA Plasmid

تم إستخلاص الدنا البلازميدي بإتباع الخطوات التالية إعتماداً على تعليمات الشركة المجهزة Promega U.S.A :(

١. نقل 600 مايكروليتر من المزروع البكتيري بعمر 18 ساعة الى أنبوبة ابندروف (1.5 مل .(
٢. اضيف 100 مايكروليتر من البفر المحلل للخلايا Cell Lysis Buffer ، ومزج الخليط عن طريق قلب الانبوبة 6 مرات .
٣. اضيف 350 مايكروليتر من محلول التعادل المبرد(4-8C°) Cold Neutralization Solution ومزجت المحتويات بالقلب عدة مرات.
٤. نبذ المزيج بوساطة المنبذة الصغيرة بسرعة 13000 دورة / دقيقة لمدة 3 دقائق .
٥. نقل الراشح تقريباً 900 مايكروليتر الى عمود تنقية Pure Yield Minicolumn وأهملت الحبيبة اللزجة المتكونة .

٦. وضع عمود التنقية داخل انبوبة الجمع Collection Tube ونبذ المزيج بسرعة 13000 دورة / دقيقة لمدة 15 ثانية .

٧. تم ازالة الراسب المتكون في أنبوبة الجمع ، وإرجاع عمود التنقية داخلها.

٨. أضيف 200 مايكروليتر من محلول Endotoxin Removal Wash الى عمود التنقية Minicolumn ونبذ المزيج بسرعة 13000 دورة/ دقيقة لمدة 15ثانية .

٩. اضيف 400 مايكروليتر من محلول Column Wash Solution الى عمود التنقية Mincolumn ونبذ المزيج بسرعة 13000 دورة / دقيقة بالمنبذة الصغيرة لمدة 30 ثانية .

١٠. نقل عمود التنقية Minicolumn الى أنبوبة إبند روف نظيفة سعة 1.5 مل ، ثم أضيف 30 مايكروليتر من محلول Elution Buffer مباشرة الى أنبوبة عمود التنقية وترك المزيج لمدة دقيقة واحدة بدرجة حرارة الغرفة .

١١. نبذ المزيج بوساطة المنبذة الصغيرة لمدة 15 ثانية ، ثم غلقت انبوبة إبندرف الصغيرة باحكام ، وحفظ الدنا البلازميدي المستخلص بدرجة °20C- وقد اصبح جاهزاً للترحيل الكهربائي.

١٣-٢-Gel الترحيل الكهربائي للدنا البلازميدي في هلام الاكاروز3 Electrophoresis

أجريت عملية الترحيل الكهربائي لفصل خليط الدنا المستخلص وفحصه :

١. تم اذابة 0.7 غم من الاكاروز في 100 مل من دارئ TBE وترك الهلام ليبرد وتصل حرارته 50 م° ، اضيف 5 مايكروليتر من محلول بروميد الايثيديوم بتركيز 5 مكغم/ مل ومزج جيداً.

٢. حضر قالب صب الهلام (Tray) وذلك باحاطة حافتي القالب بالشريط اللاصق وثبت مشط تكوين الحفر (Comb) على بعد واحد سنتمتر من احدى حافتي القالب، ثم صب الهلام داخل القالب الموضوع في وضع افقي تماماً وترك ليتصلب لمدة 30 دقيقة وفيما بعد رفع المشط والشريط اللاصق برفق ووضع القالب داخل حوض الترحيل الكهربائي المحتوي على دارئ TBE بحيث يغمر هلام الاكاروز .

٣. أجريت عملية تحميل عينات الدنا في حفر الهلام بعد مزج 10 مايكروليتر من محلول الدنا مع 3 مايكروليتر من دارئ التحميل (Loading buffer).
٤. رحلت كهربائياً تحت فرق جهد قدرة 3-4 فولت/سم وبمعدل مرور للتيار 20 ملي امبير ولمدة 1.5-3 ساعة .
٥. تم فحص الهلام بوساطة جهاز UV-Transilluminator بطول موجي مقداره 336 نانوميتر ، ثم صور بوساطة الكاميرا (O'Connell,1984).

٣-٢-١٤ تحييد الدنا البلازميدي Curing of Plasmid DNA

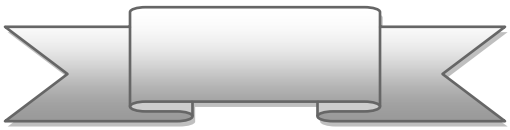
أستخدمت مادة الاكردين البرتقالي Acridin orange كمادة محيدة وبالاعتماد على (Trevors,1986) وكالاتي :

- تم عمل تخافيف مختلفة للمادة المحيدة أعلاه للحصول على التراكيز (16 , 32 , 64 , 128, 256 , 512 , 3000,2500,2000,1024 مكغم/مل) .
- لقحت الأنابيب الحاوية على هذه التراكيز بـ (٠.١) مل من البكتيريا المنماة في المرق المغذي بعمر 18 ساعة.
- حضنت الانابيب بدرجة 37 م° ولمدة 24 ساعة ، بعدها لوحظت كثافة النمو في الانابيب مع المقارنة بأنبوب السيطرة ، وحدد تأثير المادة المحيدة على نمو البكتيريا .
- تم تحديد التركيز المثبط الادنى للمادة المحيدة من خلال تحديد اقل تركيز له عمل على تثبيط نمو البكتيريا .
- عملت تخافيف عشرية للانبوب الحاوي على أعلى تركيز للعامل المحيد الذي عنده أستمرت البكتيريا بالنمو(يسمى هذا الانبوب Subminimal inhibitory concentration).
- اخذ (0.1) مل من أنابيب التخفيف (10^{-4}) الى (10^{-8}) ونشرت على وسط الأكار المغذي وحضنت بدرجة حرارة 37م° ولمدة 24 ساعة .
- تم ترحيل العزلات المحيدة بالاكاروز للتحري عن فقدانها للحزم البلازميدية التي تمتلكها العزلة الاصلية .
- تم اختبار العزلات الفاقدة للبلازميد من مقاومتها للامبسلين والاموكزاسلين.

٣-٢-١٥ التحليل الإحصائي

تم تحليل النتائج إحصائياً بإستعمال إختبار t-test (t-)عند مستوى معنوية ٥٪ ، ١٪ قبل الخلط مع MIC (٢٠١٠) لتحليل المعلومات الخاصة بقيم SPSSبإستخدام النظام الإحصائي المثبطات وبعد الخلط .

النتائج والمناقشة



١- عزل وتشخيص بكتريا الزوائف الزنجارية4

Isolation and Identification of *Pseudomonas aeruginosa*

٤-١-١ العزل Isolation

تم الحصول على (٧٥) عزلة من بكتريا الزوائف الزنجارية *P.aeruginosa* من مجموع (٣٠٤) عينة سريرية من مصادر عزل متنوعة هي (الادرار والجروح والحروق والاذن) أي بنسبة اصابة ٢٤,٦٪، جمعت من المرضى المصابين باخماج المجاري البولية وباخماج الجروح والحروق واخماج الاذن الوسطى للمدة من ٢٠١٠/٩/١ لغاية ٢٠١١/١/١٦.

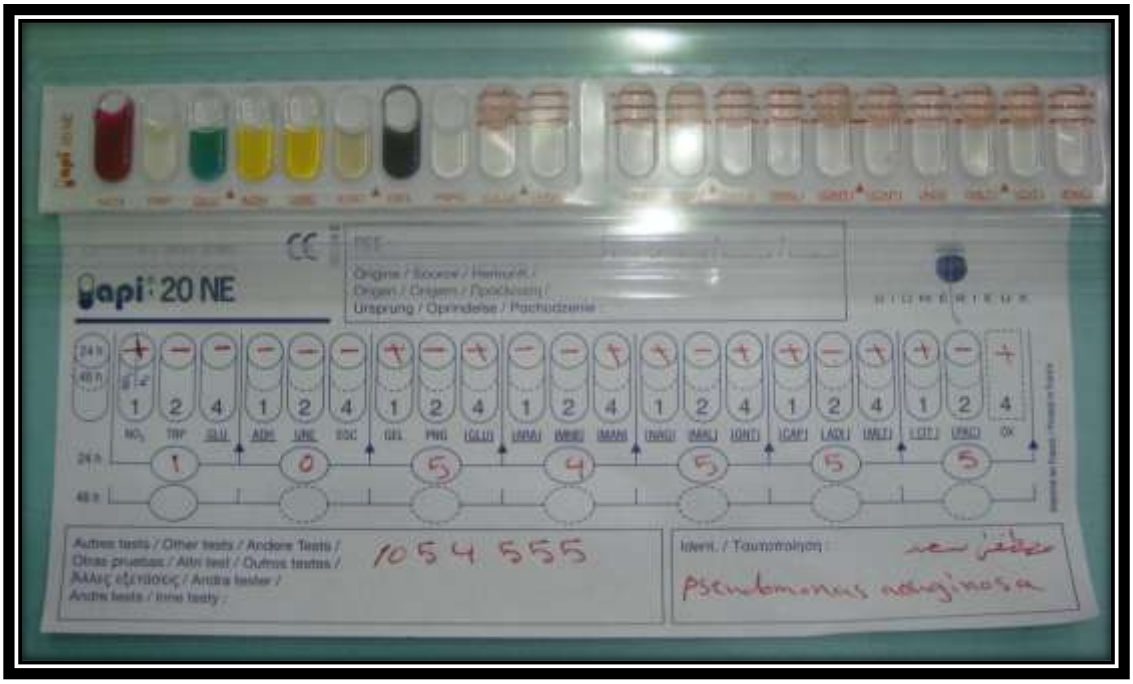
أستخدم الوسط اكار الماكونكي التفريقي ووسط اكار الدم لزراعة هذه العينات، ثم نميت بعد الانتقائي لغرض تنقيتها، وتم التأكد من *Pseudomonas* Isolation agarذلك على وسط تشخيصها بالاختبارات الكيموحيوية .

٤-١-٢ التشخيص Identification-4

شخصت عزلات بكتريا *P.aeruginosa* بالاعتماد على صفاتها المظهرية والإختبارات المجهرية والزرعية والكيموحيوية جدول (٤-١) ، إذ اظهرت هذه العزلات بأنها خلايا عصوية سالبة لملون غرام مكونة مستعمرات شاحبة اللون عند تنميتها على وسط اكار الماكونكي بوصفها غير مخمرة لسكر اللاكتوز، وبأنها مستعمرات كبيرة نسبياً وذات تحدب قليل وحافات مشرشرة أومنتظمة وغالباً ما تفرز(البايوسيانين) عند نموها على وسط الاكار المغذي الصلب وتكون لها رائحة مميزة، ولها القابلية على النمو في درجات حرارة مختلفة تتراوح بين ٤-٤٢م°، كما اثبتت) الذي يعد صفة تشخيصية مهمة لهذه Oxidaseهذه العزلات قدرتها على انتاج أنزيم الاوكسيديز ( ) وأظهرت الإختبارات بأنها مستهلكة للسترات. Catalaseالبكتريا وإنتاج أنزيم الكاتاليز (

وكانت النتائج سالبة لاختبار الاندول IMViC لتأكيد تشخيص العزلات تم اجراء الفحص وسالبة لاختبار المثيل الاحمر وسالبة لاختبار فوكس بروسكاور.

وبالاعتماد على نتائج الاختبارات المجهرية والزرعية والبايوكيميائية وفقاً لما ورد في المصادر (Macfaddin,2000; Holt *et al*.,1994)، بأن العزلات هي من النوع *P.aeruginosa* وللتأكد من تشخيص عزلات بكتريا الزوائف الزنجارية التي تم عزلها فقد تم استخدام عدة التشخيص api-20NE التي تمتاز بالسهولة والسرعة في التشخيص لتأكيد نتائج التشخيص الكيموحيوي ، شكل(٤-1).



شكل (٤-1 نتيجة تشخيص بكتريا *P.aeruginosa* بنظام api 20 NE

جدول (٤-١) الأختبارات الكيموحيوية والمجهرية والزرعية لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa*

الأختبارات	النتيجة
Gram stain	–
Oxidase	+
Catalase	+
Simmon citrate	+
Urease	Variable
K.I.A	A/nochange
H2S Production	–
Voges_ proskaure	–
Indol	–
Methyl red	–
Lactose fermentation	–

+ نتيجة موجبة **- نتيجة سالبة**

٤-١-٣ توزيع العزلات حسب موضع الاصابة :

Distribution of isolates according to source of infection

صنفت العزلات والبالغ عددها (٧٥) عزلة حسب مواضع الاصابة بعد ان تم تشخيصها على وفق ما ذكرناه ، اذ يلاحظ من الجدول (٤-٢) ان النسبة الاكبر للعزلات كانت ضمن عينات الادرار (٣١) عزلة (٤١,٣٪) من المجموع الكلي، وتلاها نسبة عزلات حالات اخماج الاذن الوسطى اذ بلغت (١٩) عزلة (٢٥,٣٪) في حين كانت نسبة العزلات في عينات الجروح (١٤) عزلة (١٨,٦٪) من المجموع الكلي اما حالات الحروق فقد كانت النسبة (١١) عزلة (١٤,٦٪) من المجموع الكلي.

جدول (٤-٢) مصدر عزل بكتريا الزوائف الزنجارية من الحالات المرضية المختلفة مع النسب المئوية للأصابة

مصدر العزل	عدد الذكور	عدد الأناث	العدد الكلي	عدد ونسب الأصابة بجراثيم

				الزوائف الزنجارية
إدرار	٥٠	٧٧	١٢٧	٣١ (٤١,٣٪)
اخماج الأذن الوسطى	٤١	٣٨	٧٩	١٩ (٢٥,٣٪)
جروح	٣١	٢٠	٥١	١٤ (١٨,٦٪)
حروق	٢١	٢٦	٤٧	١١ (١٤,٦٪)
المجموع الكلي	١٤٣	١٦١	٣٠٤	٧٥ (١٠٠٪)

وزملاؤه (٢٠٠٤) والذين Olayinkaجاءت هذه النتائج متوافقة مع ما توصل اليه أوضحوا أن أعلى نسبة إصابة بجراثيم الزوائف الزنجارية كانت من اخماج المجاري البولية إذ بلغت (٤٧) اصابة (٥١,١٪) ، تليها حالات اخماج الجروح والحروق التي بلغت (٣٨) حالة (٤١,٣٪) ، تليها اخماج الاذن الوسطى التي بلغت حالتان فقط (٢,١٪).

وزملاؤه (٢٠١٠) الذين اوضحوا ان Abdullahكما اتفقت هذه النتائج مع ما توصل اليه اعلى نسبة لجراثيم الزوائف الزنجارية كانت معزولة من حالات التهابات المجاري البولية التي بلغت (٤٠٪) مما يدل على دور هذه البكتريا في خمج المسالك البولية وخاصة لدى المرضى الذي يخضعون لعملية القثطرة وقد يعزى السبب الى عوامل الالتصاق التي تمتلكها هذه البكتريا والتي تسهل عمليه التصاقها بمواد القثطرة ومقاومتها للعديد من المضادات البكتيرية من خلال تواجدها ضمن الغشاء الحيوي الكثيف (Thic biofilm) (Brook *et al.*,2007 : Goering *et al.*, 2008.(

) بهذه البكتريا بالدرجة 4-2يأتي معدل الخمج في حالات التهابات الاذن الوسطى جدول (الثانية بعد خمج المسالك البولية (١٩) حالة (٢٥,٣٪) ، وهذه النتائج لاتتفق مع جاء به وزملاؤه (٢٠١٠)، اذ كانت نسبة العزل في دراستهم (٦) عزلات (١٢٪) من حالات Abdullah خمج الاذن الوسطى ، قد يعزى ذلك لأختلاف ظروف العزل وحجم العينة وطبيعة الظروف البيئية في مدينة بعقوبة .

أما معدل الخمج في الجروح فقد بلغ (١٤) حالة (١٨,٦٪) وقد يعود السبب الى ان هذه البكتريا تعد من الممرضات الثانوية الانتهازية إذ انها تنتهز فرصة حدوث اختلال عام او موضعي في احد دفاعات الجسم الميكانيكية او المناعية او كليهما معاً (Brooks *et al.*,2007;)، إذ استطاعت المحمدي (٢٠٠٠) من عزل (١٥) عزلة من بكتريا Goering *et al.*,2008 من مجموع (٢٠) عينة في حالات الجروح في مستشفيات بغداد أي بنسبة (٢٠) *P.aeruginosa* عينة في حالات الجروح في مستشفيات بغداد أي بنسبة (٦٨,٢٪)، كما اكدت الدراسة التي اجريت كانت *P.aeruginosa* (٢٠٠٤) ان بكتريا Orrettiفي توباكو لمجموعة من المستشفيات من قبل من اصل *P.aeruginosa*الاكثر شيوعاً في حالات الجروح اذ تم عزل (١٤١) عزلة من بكتريا (١٨٣) عينة أي بنسبة (٧٧٪).

(٢٠٠٤) في جنوب أفريقيا ان نسبة عزل هذه Oguntibeju و Nwobu أشار كل من البكتريا في التهابات الجروح كانت عالية اذا ما قورنت بباقي المسببات المرضية الاخرى اذ بلغت نسبة العزل (٣٣,٣٪).

أما معدل الخمج في حالات الحروق فقد بلغ (١١) حالة (١٤,٦٪) وقد يعود السبب الى تلوث هذه الحروق من اجواء المستشفيات والادوات والاسرة وايدي العاملين في المستشفى بهذه البكتريا (Songer,2004.)

وزملاؤه (٢٠١٠) ان نسبة عزل بكتريا الزوائف الزنجارية في حالات Abdullah أشار الحروق بلغت (٣٢٪) في مستشفيات بغداد .

الزوائف الزنجارية ٤-٢ التحري عن بعض عوامل الضراوة المهمة لبكتريا Detection of some important virulance factors of *P.aeruginosa*

على احداث الخمج يعود لامتلاكها عدداً من عوامل *P.aeruginosa* إن قابلية بكتريا ما اجتمعت هذه الضراوة ، بعضها يلعب دوراً مباشراً والبعض الاخر له دور غير مباشر فإذا العوامل فإنها ستكون المسؤولة عن إحداث الضرر في جسم المضيف ، أخضعت جميع العزلات البالغة (٧٥) عزلة لدراسة هذه العوامل وقد كانت النتائج كما يأتي :

٤ ١-٢-Lecithinase Production إنتاج انزيم الليسيثينيز

تم التحري عن قدرة العزلات على إنتاج أنزيم الليسيثينيز وأظهرت النتائج إن جميع العزلات قيد الدراسة تتصف بقدرتها العالية على إنتاج أنزيم الليسيثينيز إذ كانت نسبة العزلات المنتجة ١٠٠٪ بأستخدام وسط البيض Egg Yolk agar إذ تكونت مناطق رائقة حول المستعمرات وهذا يتفق مع ما أكده الباحث Al-Tikrity (٢٠٠٩) على قدرة عزلات جدول (٤-٣) ، النامية بكتريا *P.aeruginosa* على إنتاج هذا الأنزيم بنسبة (١٠٠٪) وتكمن آلية عمل هذا الأنزيم في تحطيم Lecithin (phosphatidyl cholin) وهو مكون للأغشية الخلوية لكائنات حقيقية النواة مما يسمح لبكتريا *P.aeruginosa*. بالإنتشار

٤-٢-١ إنتاج الهيمولايسين Hemolysin Production

قابلية عزلات بكتريا الزوائف الزنجارية على إنتاج الهيمولايسين من خلال تنميتها اختبرت في وسط أكار الدم الحاوي على ٥٪ دم الانسان ، وقد أظهرت النتائج إن عدد العزلات المنتجة

لانزيم الهيمولايسين (٦٧) عزلة مما يشكل نسبة (٨٩,٣٪) من مجموع العزلات الممرضة البالغ ، تتفق هذه النتيجة مع ما توصلت اليه العبيدي (٢٠٠٢) التي وجدت ان (٨٨,٤٦٪) (٧٥) عزلة كانت لها القابلية على انتاج الهيمولايسين ، كذلك جاءت هذه النتيجة *P.aeruginosa*من عزلات كانت *P.aeruginosa* (٢٠٠٦) الذي وجد ان ٨٦٪ من عزلات Qasimمقاربة لما توصل اليه) الى ان النسبة المئوية لانتاج أنزيم Aouf,2001لها القابلية على انتاج الهيمولايسن، بينما اشار (بلغت حوالي ٦٢,٧٪.*P.aeruginosa*الهيمولايسين في عزلاته الممرضة

٤-٢-٣ إنتاج أنزيم البروتييز Production Protease

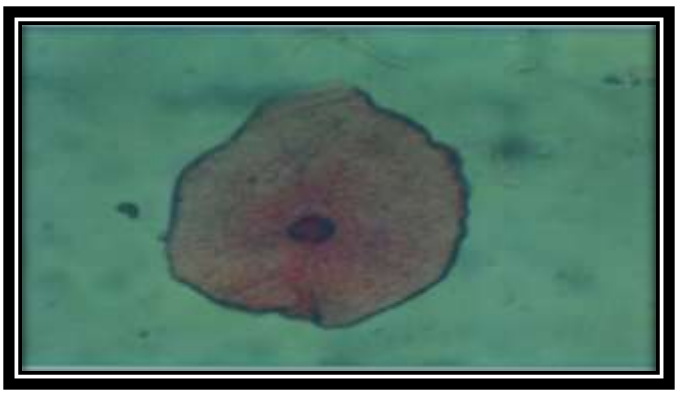
على إنتاج أنزيمات البروتييز *P.aeruginosa*قابلية جميع عزلات بكتريا أختبرت) وأظهرت النتائج ان (٨٨٪) من Skimmed Milkالخارجية باستخدام وسط حليب الفرز (، تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل اليه العزلات كانت منتجة لانزيم البروتييز جدول(٤-٣) (٢٠٠٩) الذي أشار الى ان (٨٦,١٪) من سلالات الزوائف الزنجارية لها القابلية Al-Tikrity على إنتاج البروتييز القاعدي ، وكذلك تتفق مع ما توصلت إليه الشويخ (٢٠٠٦) التي ذكرت أن (٨٦٪) من العزلات أظهرت قابليتها على إنتاج البروتييز القاعدي .

(٢٠٠٥) التي وجدت إن جميع Al-Saffar تختلف هذه النتيجة مع ما توصلت اليه الباحثة عزلات الزوائف الزنجارية كانت لها القابلية على إنتاج انزيم البروتييز .

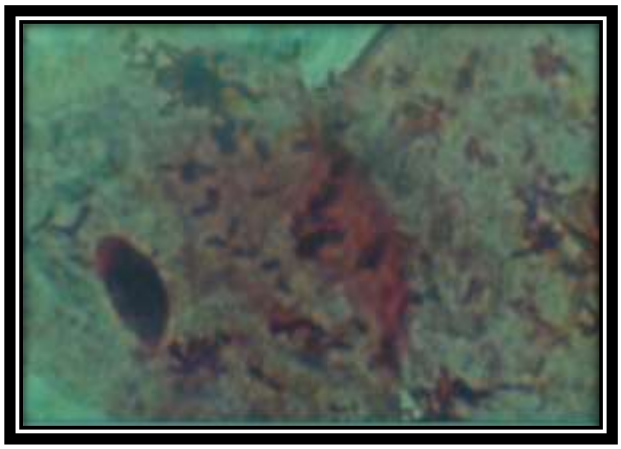
٤-٢-٤ اختبار قابلية العزلات على الالتصاق بالخلايا الطلائية

تعد قابلية البكتريا على الالتصاق من عوامل الضراوة المهمة في احداث اول خطوة في امراضية البكتريا، تظهر النتيجة الموجبة من خلال حصول التصاق الخلايا البكتيرية وبشدة على سطوح الخلايا الطلائية (المعزولة من إدرار أشخاص غير مصابين) ، إذ ظهرت خلايا البكتريا بشكل مفرد او بشكل تجمعات ملتصقة على الخلايا الطلائية كما في الشكل (٤-٣) مقارنة مع السيطرة السالبة وهي عبارة عن خلايا طلائية فقط الشكل (٤-٢). تبين نتائج الجدول (٤-٣) ان (٦٥) عزلة من المجموع الكلي للعزلات الخاضعة للدراسة أي بنسبة (٨٦,٦٪) لها القابلية على الالتصاق بالخلايا الطلائية الظهارية.

وزملاؤه (٢٠٠١) ، ان التصاق الميكروبات على السطوح الطلائية تعد مرحلةDrago أشار (٢٠٠٤) ان لعوامل الالتصاق اهمية Wesleyاولية واساسية لحدوث الاصابة ، كما ذكر الباحث كبيرة في استيطان البكتريا المسببة للالتهابات في انسجة الجسم، اذ تلتصق الاهداب بطبقة الـ) الموجود في الخلايا الطلائية، وهذا له علاقة بالتهابات حويض الكلية Glycolipid( ). تشير الدراسات الحديثة الى ان التراكيب الخيطية او بروتينات الغشاء Pyelonephritis( ) تسهل Adhesins) هي بمثابة لواصق (Glycoproteins) والكلايكوبروتين (LPSالخارجي ( ) عملية تثبيت الكائن المجهري بانسجة المضيف (Cortes *et al*.,2002; Sherlock *et al*., 2004.)



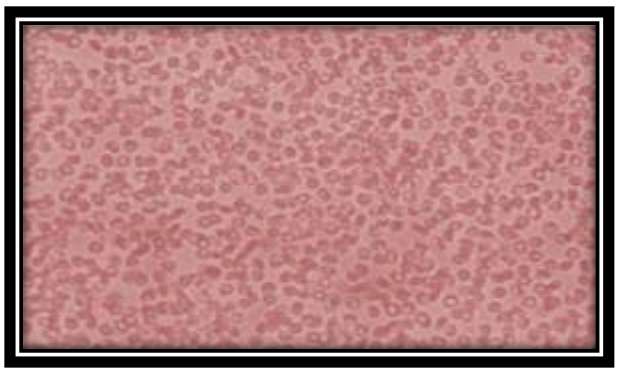
شكل (٤-٢) الخلايا الطلائية كسيطرة سالبة تحت العدسة الزيتية (١٠٠)X



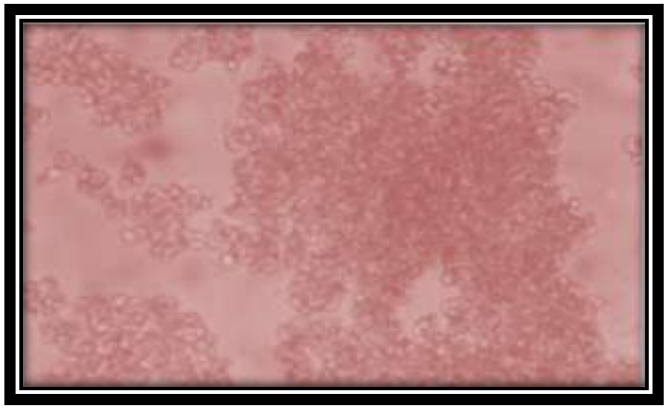
شكل (٤-٣) نتيجة اختبار موجبة لألتصاق بكتريا *P.aeruginosa* بالخلايا الطلائية الظهارية تحت العدسة الزيتية (١٠٠)X

٤-٢-٥ اختبار التلازن الدموي Slid hemagglutination test

بينت نتائج فحص التلازن الدموي وبإستخدام الشريحة الزجاجية ان (٦١) عزلة من مجموع العزلات (٧٥) الخاضعة للدراسة أي بنسبة (٨١,٣٪) كانت تمتلك القابلية على تلزين كريات الدم الحمر للانسان، جدول (٤-٣) وظهرت كريات الدم الحمر الملزنة بشكل تجمعات حدوث تغير في مظهرها العام اذ ظهرت بشكل مجعد الشكل (٤-٥)، فيما متراصة، كما لوحظ احتفظت كريات الدم الحمر غير الملزنة بشكلها الطبيعي (الدائري) الشكل (٤-٤)، تتفق هذه النتيجة مع ما توصلت اليه الباحثة العبيدي (٢٠٠٢) التي وجدت ان (٨٤,٤٪) من وزملاؤه (٢٠٠٤)Sherlock كانت لها القابلية على تلزين كريات الدم ، كما أكد *P.aeruginosa* وزملاؤه (١٩٩٧) ان تفسير فعالية التلازن الدموي التي تقوم بها العديد من الانواع Merinoو البكتيرية هو إمتلاكها اللواصق المتمثلة بالتراكيب البروتينية الموجودة على سطح الخلية الخارجي ، ويعد وجودها ضرورياً في تطور الحالة المرضية (Pathogenesis).



شكل (٤-٤) كريات الدم الحمراء الطبيعية (Control) تحت القوى (٤٠X)



شكل (٤-٥) نتيجة أختبارموجبة لتلزين كريات الدم الحمراء تحت القوى (٤٠X)

٤-٢-٦ انتاج انزيم اليوريز Urease Production

اوضحت نتائج الدراسة ان (٣٧) عزلة من مجموع العزلات (٧٥) الخاضعة للدراسة أي بنسبة (٤٩,٣٪) كانت تمتلك القابلية على إنتاج أنزيم اليوريز جدول (٤-٣) ، وتتأتى أهمية هذا الانزيم من قابليته على تحليل اليوريا الى الامونيا NH_3 وحامض الكاربونيك H_2CO_3) Tanak *et al.*,2003) إذ يسبب هذا الأنزيم إعتلالاً دماغياً ناشئاً عن الأمونيا الذي يدعى (Amonia Encephalopathy) بسبب عدم أيض الأمونيا الزائدة في الكبد (Tanak *et al.*,2003.) الذي يتأثر بتغير درجة حموضة Phenol red أستخدم وسط اليوريا الحاوي على الدليل (الوسط ، لذا فان الامونيا سوف تعمل على رفع الرقم الهيدروجيني للوسط مما يؤدي الى تغيير لون الدليل الى اللون الوردي ، وبذلك استدل على ايجابية النتيجة (Konemon *et al.*,1992.)

على إنتاج بعض عوامل الضراوة *Pseudomonas aeruginosa*)قابلية عزلات4-3جدول(

رقم العزلة	انتاج انزيم الليسيثينيز Lecithenase	انتاج الهيمولاسين HP	انتاج انزيم البروتييز Protease	الالتصاق بالخلايا الطلائية الظهارية UECs	تلزين خلايا الدم الحمراء HA	انتاج أنزيم اليورييز Urease
PU1	+	+	+	**+	_	+
PU2	+	_	_	**+	*+	+
PU٣	+	+	+	++	*+	+
PU٤	+	+	+	**+	*+	+
PU٥	+	+	+	**+	*+	+
PU٦	+	+	+	**+	*+	+
PU٧	+	+	-	++	*+	+
PU٨	+	+	+	**+	*+	+
PU٩	+	+	+	_	_	+
PU١٠	+	+	+	+++	*+	+
PU11	+	+	+	**+	*+	_
PU١٢	+	_	_	**+	*+	+
PU١٣	+	+	+	**+	*+	+
PU١٤	+	+	+	**+	_	+
PU15	+	+	+	++	*+	+
PU١٦	+	+	+	_	_	_
PU17	+	+	+	**+	*+	+
PU١٨	+	+	+	**+	+*	+
PU١٩	+	+	+	**+	*+	+
PU20	+	+	+	++	*+	+
PU21	+	+	+	**+	_	+
PU٢٢	+	+	+	_	_	+
PU23	+	+	+	_	_	+
PU٢٤	+	+	+	**+	*+	+
PU25	+	+	+	++	*+	+

+	*+	**+	+	+	+	PU26
+	*+	**+	+	+	+	PU۲۷
+	*+	++	+	+	+	PU28
+	*+	**+	_	_	+	PU۲۹
+	*+	**+	+	+	+	PU30
+	*+	**+	+	+	+	PU۳۱
+	*+	**+	+	+	+	PE32
_	*+	++	+	+	+	PE۳۳
_	*+	+++	+	+	+	PE34
+	*+	**+	+	+	+	PE۳۵
_	*+	**+	+	+	+	PE36
_	*+	**+	_	_	+	PE۳۷
_	_	**+	+	+	+	PE38
+	*+	**+	+	+	+	PE۳۹
_	*+	++	+	+	+	PE40
_	*+	**+	+	+	+	PE٤١
_	*+	**+	+	+	+	PE42
_	_	_	+	+	+	PE٤۳
_	*+	+++	+	+	+	PE44
_	*+	**+	+	+	+	PE45
_	*+	**+	+	+	+	PE46
+	*+	++	+	+	+	PE47
_	*+	**+	+	+	+	PE48
+	*+	**+	_	_	+	PE49
_	*+	_	+	+	+	PE50
_	*+	**+	+	+	+	PW51
_	*+	**+	+	+	+	PW52
_	*+	**+	+	+	+	PW53
_	*+	**+	+	+	+	PW54
_	_	**+	+	+	+	PW55
_	*+	+++	_	_	+	PW56
_	*+	**+	+	+	+	PW57
_	*+	**+	+	+	+	*PW58*
_	_	_	+	+	+	PW59
_	_	_	+	+	+	PW60
+	_	_	+	+	+	PW61
_	*+	+++	_	_	+	PW62
_	*+	**+	+	+	+	PW63
_	*+	++	+	+	+	PW64
+	_	+++	+	+	+	PB65
_	*+	**+	+	+	+	PB66
_	*+	**+	+	+	+	PB67
_	*+	++	+	+	+	PB68
_	*+	**+	+	+	+	PB69

PB70	+	+	+**	*+	_
PB71	+	+	+	++	*+	_
PB72	+	+	+	_	_	_
PB73	+	+	+	**+	*+	+
PB74	+	+	+	+++	*+	_
PB75	+	_	_	++	*+	_

+ : امتلاكها لعامل الضراوة **-** : تدل على عدم امتلاك البكتريا لعامل الضراوة

كريات الدم الحمراء; تلزين

+* : تلازن اكثرمن(١٠) من كريات دم حمراء النتيجة موجبة

تلازن اقل من(١٠) من كريات دم حمراء النتيجة سالبة: **-**

يشير الى العزلات المعزولة من الادرارPU **الالتصاق بالخلايا الطلائية الظهارية**

يشير الى العزلات المعزولة من الاذنPE **+** ** التصاق اكثر من (٢٠) خلية بكتيرية

يشير الى العزلات المعزولة من الجروحPW **+ +** التصاق اكثر من (٤٠) خلية بكتيرية

يشير الى العزلات المعزولة من الحروقPB**+++** التصاق اكثر من (٨٠) خلية بكتيرية

٣- حساسية بكتريا الزوائف الزنجارية للمضادات الحيوية 4

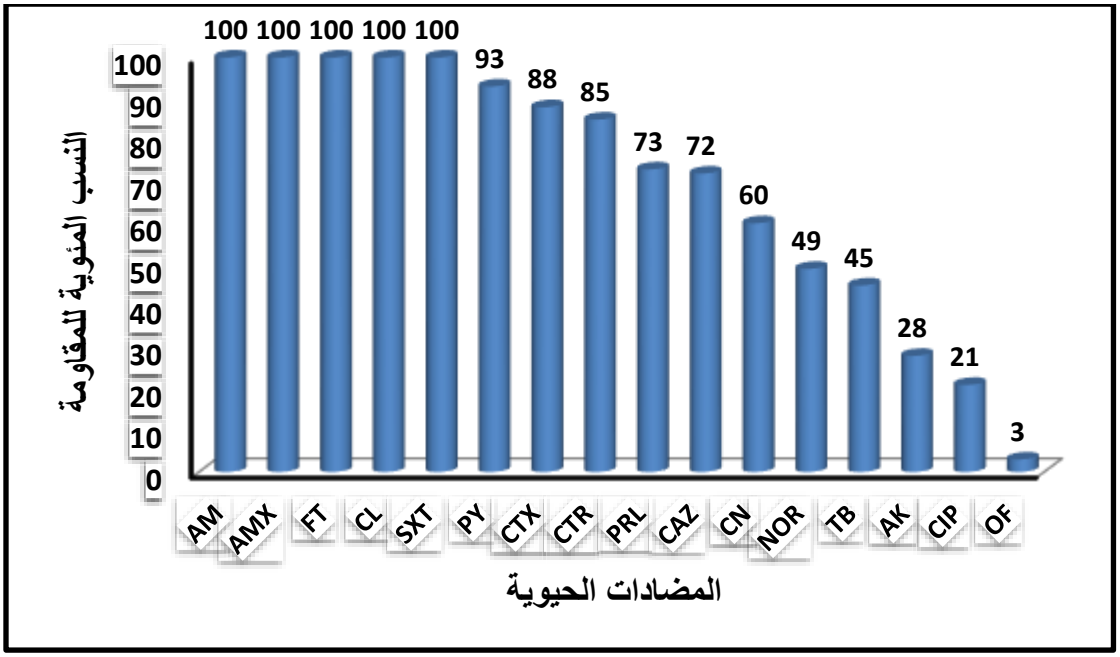
Antibiotic senitivty tests of *P.aeruginosa*

أختبرت حساسية جميع عزلات (*P.aeruginosa*) نوع من 16 (٧٥) عزلة تجاه المضادات الحيوية ، معظمها من الانواع الشائعة الاستخدام في القطر لعلاج الاصابات المختلفة لمعرفة نوع الاستجابة من خلال قياس قطر منطقة التثبيط ومقارنة النتائج مع ما ورد في NCCLS(2002).(٣) ، ملحق

أظهرت نتائج الدراسة تبايناً واضحاً في مقاومة بكتريا الزوائف الزنجارية للمضادات الحيوية ، فقد قاومت جميع العزلات قيد الدراسة مضادات Amoxicillin و Ampicillin وبنسبة ١٠٠٪ ، وهذه النتائج متفقة مع Co-Trimoxazolو Nitrofourantoinو Cephalexin وزملاؤه (٢٠١٠)، إذ كانت عزلاتهم مقاومة Abdullah (٢٠٠٥) و AL-Saffarما توصلت اليه لهذه المضادات وبنسبة ١٠٠٪ ، الشكل (٤-٦) .

أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (٤-٦) ان نسبة مقاومة العزلات للمضاد Carbencillin بلغت ٩٣٪ وهذه النتائج مقاربة لما توصلت اليه العبيدي (٢٠٠٢) إذ كانت نسبة المقاومة لهذا المضاد في عزلاتها ٩٢٪، والصفار (٢٠١٠) اذ كانت نسبة المقاومة لهذا المضاد في (٢٠٠١) اذ بلغت نسبة المقاومة Aoufعزلاتها ٩٢,٩٨٪، ولا تتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه لهذا المضاد في عزلاته ٧٥٪، وقد يعود سبب هذه المقاومة الى قلة نفاذية الجدار الخارجي وكذلك افراز انزيمات البيتالاكتاميز وانظمة الدفق للجزيئات الصغيرة المحبة للماء مثل المضادات الحيوية (Livermore,2002.)

كما يشير الشكل (٤-٦) الى ان نسبة المقاومة تجاه المضادات Cefotaxime ، بلغت ٨٨٪، ٨٥٪ ،٧٢٪ على التوالي. وهذه النتائج مقاربة لما ceftazidime، Ceftriaxone في عزلاته ٩٢٪، Cefotaxime (٢٠٠٦) إذ بلغت نسبة المقاومة لمضاد Qasimتوصل اليه (٢٠٠٩) اذ بلغت نسبة مقاومة Al-Gherawi وتختلف هذه النتائج مع ما توصلت اليه الباحثة في عزلاتها ٦٦,٧٪، وقد بينت الصفار (٢٠١٠) ان نسبة مقاومة بكتريا Cefotaximeمضاد ، % هي (٦٧,٥٤Ceftazidime، Ceftriaxone، Cefotaxime الى *P.aeruginosa* ٧٨,٩٤٪، ٦٥,٧٨٪) على التوالي وهي بذلك تختلف عن النتيجة التي تم التوصل اليها في هذه وزملاؤه (٢٠٠٧) اذ بلغت نسبة Rashidالدراسة ، وتتفق نتائج هذه الدراسة مع ما توصل اليه في عزلاتهم ٨٦,١٪، وجاءت نتائج الدراسة الحالية مقاربة لما Ceftriaxoneمقاومة مضاد في Ceftazidime وزملاؤه (٢٠١٠) اذ بلغت نسبة المقاومة لمضاد Abdullahتوصل اليه عزلاتهم ٧٨٪ .



شكل (٤-٦) النسب المئوية لمقاومة بكتريا الزوائف الزنجارية للمضادات الحيوية المختلفة

AM = Ampicillin AMX = Amoxicillin FT = Nitrofurantoin CL = Cephalexin SXT = Co-Trimoxazole
PY = Carbencillin CTX = Cefotaxime CTR = Ceftriaxone PRL = Piperacillin CAZ = Ceftazidime
CN = Gentamicin NOR = Norfloxacin TB = Tobramycin AK = Amikacin CIP = Ciprofloxacin
OF = Oflaxacin

أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (٤-٦) ان نسبة مقاومة العزلات للمضاد وزملاؤه (٢٠١٠) Abdullah هي ٧٣٪، ولا تتفق هذه النتيجة مع ما توصل اليه Piperacillin اذ بلغت نسبة مقاومة هذا المضاد في عزلاتهم ٢٤٪.

أما مجموعة الامينوكلايكوسايد التي شملت كل من مضادات Gentamicin ، ٢٨٪ ، و فقد بلغت نسبة المقاومة لها في هذه الدراسة ٦٠٪ ، و٤٥٪Amikacin، Tobramycin

على التوالي وجاءت نتائج هذه الدراسة مقاربة لما توصلت اليه العبيدي (٢٠٠٢) التي اشارت الى ان نسبة مقاومة العزلات لمضاد Tobramycin هي ٤٦٪ ، وقد بينت Al-Gherawe (٢٠٠٩) ان نسبة مقاومة بكتريا *P.aeruginosa* لمضاد Gentamicin هي ٦٦٪، وهي مقاربة للنتيجة التي تم التوصل اليها في هذه الدراسة، وقد لوحظ نتائج مختلفة لمضاد الجنتامايسين مع ما ذكرته العبيدي (٢٠٠٢) في ان نسبة المقاومة لهذا المضاد في عزلاتها كانت ٤٢٪، وتتفق نتائج هذه الدراسة مع ما توصلت اليه الصفار (٢٠١٠) اذ بلغت نسبة مقاومة عزلاتها لمضاد Amikacin ٢٨,٩٤٪.

أما مجموعة Quinolones التي تضم مضاد Norfloxacin و Ciprofloxacin فقد بلغت نسبة المقاومة لها ٤٩٪ و ٢١٪ و ٣٪ على التوالي وتتفق هذه النتائج مع ما توصلت اليه العبيدي (٢٠٠٢) والصفار (٢٠١٠) اذ كانت نسبة مقاومة عزلاتهم لمضاد Ofloxacin وزملاؤه (٢٠١٠) Abdullah هي ٢٣٪، وتختلف هذه النتيجة مع ما توصل اليه Ciprofloxacin الذين اشاروا الى نسبة مقاومة مضاد Ciprofloxacin هي ٤٪، كما جائت نتائج الدراسة الحالية مقاربة لما توصل اليه Abdullah وزملاؤه (٢٠١٠) اذ وجدوا ان جميع عزلاتهم كانت حساسة لمضاد Ofloxacin.

الزنجارية تتفق نتائج هذه الدراسة مع العديد من الدراسات التي بينت مقاومة جراثيم الزوائف فضلا عن ، β-lactams للعديد من المضادات الحيوية إذ إنها مقاومة لمضادات البيتالاكتام و Oflaxacin باستثناء مضاد Fluoroquinolone مقاومتها العاليه لمضادات Aminoglycoside وهو ما يجعلها صعبة العلاج Abdullah *et al* .,2010). (

٤- المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية 4

Multiple Antibiotic Resistance

أصبحت مقاومة العزلات المرضية ولاسيما المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية مشكلة اخذت بالتزايد الامر الذي يؤدي الى صعوبة في اختيار العلاج المناسب وبالتالي ازدياد نسبة الوفيات(Karlowsky *et al* .,2003; Bradford,2001.)

المحلية قيد الدراسة تحمل صفة *P.aeruginosa* أظهرت الدراسة الحالية ان جميع عزلات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية (مقاومة لاكثر من مضاد حيوي واحد)، تشير النتائج ان المعزولة من الحروق كانت اكثر العزلات مقاومة للمضادات الحيوية إذ (PB71العزلة ( ) فهي العزلات PE34، PU4اما العزلات (٤-٤) جدول(استطاعت مقاومة ١٥ مضاداً حيوياً الاقل مقاومة حيث إنها قاومت (٧) مضادات حيوية فقط فهي العزلات الاكثر حساسية بين العزلات قيد الدراسة. وتتفق هذه النتائج مع ما توصلت اليه العبيدي (٢٠٠٢) من أن اكبر مقاومة كانت من (١٥) مضاداً من قبل عزلة واحدة في حين كانت اقل مقاومة هي *P.aeruginosa* نصيب بكتريا

(٩) مضادات من قبل عزلتين، مما يشير الى وجود المقاومة المتعددة للمضادات، كما اوضح معزولة من مرضى مصابين بالتهابات *P.aeruginosa* (٢٠٠٦) في دراسة على بكتريا Qasim مختلفة في مدينة بغداد تملك صفة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية ، اذ لاحظ ان أعلى نسبة للمقاومة في عزلاتها كانت (٥٦٪) وهي تمثل نسبة العزلات المقاومة لمدى من المضادات يتراوح بين (٦-٨) مضاد من المضادات المستخدمة في الدراسة ، وان أقل نسبة مدى مقاومة كانت (٤٪) وهي تتمثل بالعزلة المقاومة لمضادين فقط من مجموعة المضادات المستخدمة .

إن عدم توافر العلاج الفعال ضد البكتريا التي تملك صفة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية البحث لإيجاد مضادات حديثة فعالة هي مشكلة خطيرة على صحة الانسان مما يستدعي الحاجة الى ضد هذه البكتريا (Ueda&Sunagawa,2003 ; Murray, 1999.)

جدول (٤-٤) المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية التي اظهرتها عزلات بكتريا P.aeruginosa

عدد المضادات التي قاومتها العزلات	عدد العزلات	ارقام العزلات
7	2	PE34 , PU4
8	4	PE46,PE35,PE32,PU21
9	6	PW52,PE44,PE36,PE33,PU28
10	11	,PE42,PE40,PU30,PU23,PU15,PU13,PU12,PU9,PU7 PB72,PB65
11	20	,PE38,PU27,PU24,PU22,PU19,PU18,PU11,PU5,PU3 ,PW61,PW60,PW59,PW56,PW53,PW51,PE48,PE45 PB69,PB68,PW62
12	15	PE50,PE43,PE39,PE37,PU29,PU28,PU17,PU16,PU1 PB75,PB74,PB70,PB67,PW57,PW55,
13	13	,PE49,PE41,PU26,PU25,PU20,PU14,PU8,PU6,PU2 PB73,PB66,PW58,PW54
14	٣	PW64,PE47,PU10
15	1	PB71

قيد الدراسة الى مجموعتين على أساس عدد *P.aeruginosa* تم تقسيم عزلات بكتريا المضادات التي قاومتها جدول (٤-٥) اذ وضعت العزلات المقاومة (٦-١٠) مضاد حيوي في المجموعة الاولى أما العزلات المقاومة الى (١١-١٥) مضاداً حيوياً وضعت في المجموعة الثانية، كانت المجموعة الثانية هي المجموعة السائدة في الدراسة وتحتوي على (٥٢) عزلة بكتيرية مقاومة (١١-١٥) مضادا حيويا وبنسبة ٦٩,٣٣٪ من المجموع الكلي للعزلات الخاضعة للدراسة، وجاءت

(٢٠٠٦) الذي وجد ان المجموعة السائدة تشكل Qasimنتائج هذه الدراسة مقاربة لما توصل اليه المعزولة من مصادر سريرية مختلفة ، بينما كانت اقل *P.aeruginosa*نسبة (٥٦٪) بين العزلات نسبة مقاومة متعددة للمضادات الحيوية ضمن الدراسة الحالية أظهرتها المجموعة الاولى وكانت ٣٠,٦٦٪ من العزلات الكلية .

جدول (٤-٥) تقسيم العزلات المحلية لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* الى مجموعتين على اساس عدد المضادات التي تقاومها

المجموعة	عدد المضادات التي قاومتها	عدد العزلات المقاومة	النسبة المئوية (%)
١	٦ – ١٠	٢٣	30.66
٢	١١ – ١٥	52	69.33
المجموع		75	% ١٠٠

٤-٥النسق السائد للمقاومة المتعددة لبكتريا *P.aeruginosa* للمضادات الحيوية

أظهرت نتائج الدراسة ان نسق المقاومة السائد للمقاومة المتعددة للمضادات الحيوية يقع ضمن المجموعة الثانية جدول(٤-٥) ، وبعد تحليل المعلومات الخاصة بمقاومة كل عزلة للمضادات الحيوية المستخدمة في هذه الدراسة تبين أن نسق المقاومة السائد لعزلات *P.aeruginosa* قيد الدراسة هو احد عشر مضادا جدول (٤-٦) وكما ياتي :-

AM – AMX – FT- CL – SXT-PY-CTX-CTR-PRL-CAZ-CN

٤-٦) يتضح ان هناك جين مقاومة لمضاد واحد يضاف الى نسق (من النتائج المسجلة في الجدول لدرجات المقاومة ١٤,١٣,١٢ ضمن المجموعة الثانية على NOR-TB-Akالمقاومة للمضادات التوالي.

وبعد مقارنة النتائج مع ما توصلت اليه العبيدي (٢٠٠٢) لوحظ تقارب بالنتائج إذ كان النسق السائد للمقاومة المتعددة لدى العبيدي هو ثلاثة عشر مضادا وهي كالاتي :-

AMP- AMX- TE- KF-FT-S-PY-SXT-TOB-PRL-RD-CTX-GM

جدول (٤-٦) النسق السائد للمقاومة المتعددة للمضادات الحيوية ضمن المجموعة

نوع المضادات	درجة تعدد المقاومة
Am –Amx –FT- CL- SXT-PY-CTX-CTR-PRL-CAZ-CN	١١
Am –Amx –FT- CL- SXT-PY-CTX-CTR-PRL-CAZ-CN-NOR	١٢
Am –Amx –FT- CL- SXT-PY-CTX-CTR-PRL-CAZ-CN-NOR-TB	١٣
Am –Amx –FT- CL- SXT-PY-CTX-CTR-PRL-CAZ-CN –NOR-TB-AK	١٤

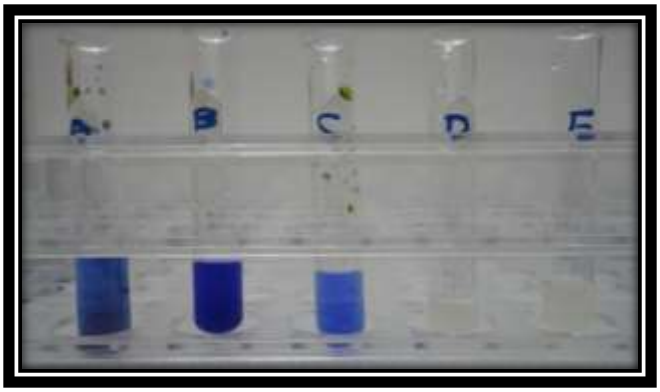
٤-٦ الانتقاء الاولي للعزلات المقاومة لمضاد الامبسلين

أظهرت جميع العزلات مقاومة لمضاد الامبسلين واستطاعت النمو في تركيز ١٠٠مكغم/مل مما يعطي انطباعا عن عدم فعالية هذا المضاد ضد البكتريا، وربما يعود سبب مقاومة البكتريا لهذا المضاد نتيجة الاستعمال العشوائي او الى سوء اختيار الجرعة المناسبة وهذا ما اكده الباحثان (Sanders& Sanders, 1992).

٤-٧ التحري عن أنتاج أنزيم البيتالاكتاميز

Detection of β-lactamase Production

أعتمدت طريقة اليود القياسية السريعة للتحري عن قابلية انتاج انزيم البيتالاكتاميز لكافة العزلات قيد الدراسة ، وهي من الطرائق السريعة في اعطاء النتائج وغير المكلفة وسهلة التطبيق ( ) كونه يمثل Substrateلتوافر المواد اللازمة لعمل الاختبار، وهي تستخدم البنسلين جي كركيزة ( )، تعتمد طريقة Bush *et al.*,1995الاساس لعمل انواع انزيمات البيتالاكتاميز جميعاً ( ) Pencillioc acidاليود القياسية السريعة على اساس واحد هو الكشف عن حامض البنسلويك (Sykes&Mattew,1976) في حلقة البيتالاكتام Amide bandالمتكون من كسر اصرة الامايد ، إذ يتكون معقد بنفسجي غامق ويبقى مستقراً بدون انتاج أنزيم البيتالاكتاميز دلالة على النتيجة على التوالي ،PU4,PE38,PW62 للعزلات A,B,C) الأنابيب7السالبة الموضحة في الشكل (٤-وفي حالة انتاج أنزيم البيتالاكتاميز فإن حامض البنسلويك المتكون نتيجة فعالية الانزيم سوف يقوم والاخير ليس له قابلية التفاعل مع النشأ مما يؤدي Iodide) الى يوديد (Iodineباختزال اليود ( ) الانابيب 7الى تحوله الى اللون الابيض دلالة على النتيجة الموجبة كما في الشكل (٤-D,E) على التوالي. PU10,PB71للعزلات



) فحص التحري عن أنتاج أنزيم البيتالاكتاميز7شكل (٤-

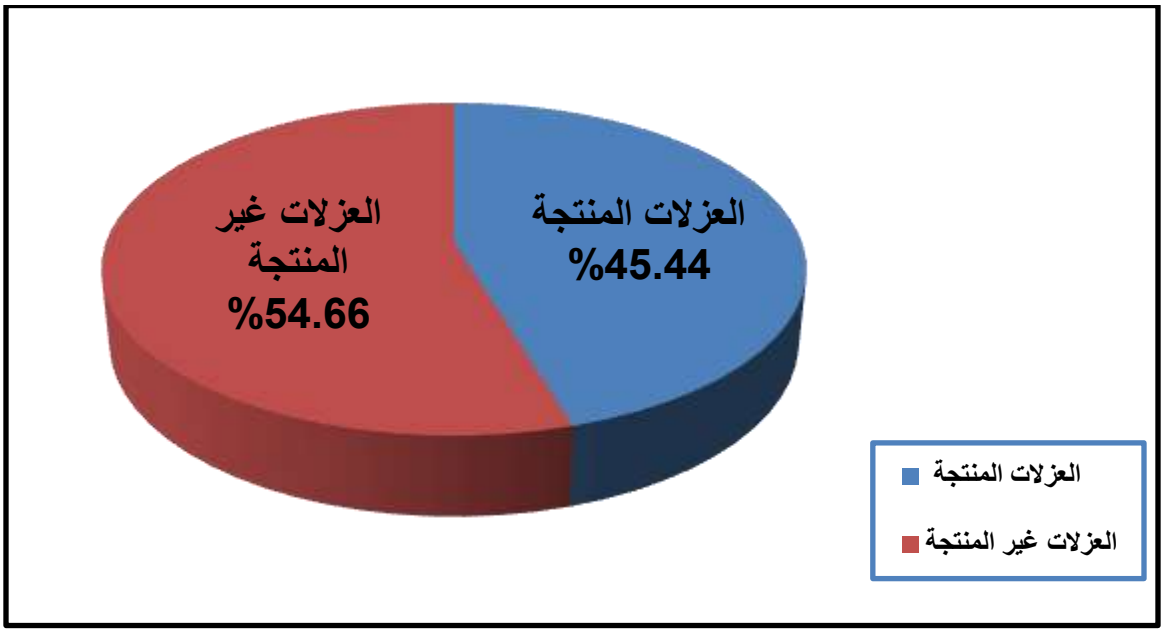
PE38 النتيجة السالبة للعزلة B_ PU4 النتيجة السالبة للعزلة A_
PU10 _النتيجة الموجبة للعزلةD PW62 النتيجة السالبة للعزلةC_
PB71 النتيجة الموجبة للعزلةE_

P.aeruginosa) عزله لبكتريا 75 عزلة من مجموع () أظهرت نتائج هذه الدراسة أن (٣٤ الخاضعة للدراسة أعطت نتيجة موجبة لفحص إنتاج البيتالاكتاميز أي نسبة (٤٥,٤٤٪) جدول(٤-
) ، يلاحظ من الجدول ان العزلات 8(٤-) وشكل7
كانت PU1,PU10,PU14,PU25,PU26,PE32,PE41,PE47,PW64,PB67,PB71,PB72) الاسرع في اعطاء النتيجة الموجبة خلال ثوان معدودات أي انها الاعلى من حيث إنتاجها لانزيمات البيتالاكتاميز مقارنة بالسلالة القياسية *E.coli* ATCC10536 وبالرجوع الى جدول
٤١) عزلة من أصل (٧٥) عزلة أي نسبة ٥٤,٦٦٪ غير منتجة لانزيمات (التحري نجد ان البيتالاكتاميز مقارنة بالسيطرة السالبة متمثلة بالسلالة القياسية *P.aeruginosa* ATCC154427 ،
وقد يعزى ذلك الى امتلاك هذه العزلات لاليات اخرى للمقاومة غير الية انتاج انزيمات البيتالاكتاميز مثل امتلاكها حاجز النفاذية او حدوث تغيير في بروتينات الغشاء الخارجي مما يؤدي الى تغيير في موقع الهدف (Pope *et al.*,1998) او نتيجة لامتلاكها انظمة الدفق
)Chuanchune *et al.*,2001. (

يمكن تفسير الاختلاف في وقت اعطاء النتيجة الموجبة اعتمادا على تركيز انزيم البيتالاكتاميز المنتج من قبل البكتريا (Plaucha *et al.*,1999) اذ كلما كان تركيز الانزيم اكثر كلما كان الوقت اللازم لظهور النتيجة الموجبة اقل والعكس صحيح، يعود الامر في ذلك الى الجينات المشفرة لهذه الانزيمات ان كانت بلازميدية او كروموسومية ومن نوع الانزيمات المتكونة اساسا او المستحثة (Phillippon *et al.*,2002.)

وتتفق هذه النتيجة مع ما توصلت اليه العبيدي (٢٠٠٢) عندما وجدت ان نسبة بكتريا *P.aeruginosa* المنتجة لانزيمات البيتالاكتاميز تصل الى ٤٦,١٥٪، بينما وجد الباحث Strateva (٢٠٠٧) وزملاؤه ان (٦٦,٨٪) من عزلات بكتريا *P.aeruginosa* المعزولة من مصادر مختلفة منتجة لانزيمات البيتالاكتاميز وذلك من خلال دراستهم على ٢٠٣ عزلة بكتيرية ،

وزملاؤه (٢٠٠٥) في دراسة قاموا بها في كوريا الى ان نسبة بكتريا Lee واشار الباحث المنتجة لانزيمات البيتالاكتاميز كانت (٢٥,٤٪).*P.aeruginosa*



) النسبة المئوية للعزلات المنتجة وغير المنتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز8 شكل (٤-

على إنتاج*P. aeruginosa*) قابلية العزلات المحلية لبكتريا 7جدول (٤-

β- Lactamase أنزيم البيتالاكتاميز

رقم العزلة	انتاج انزيم البيتالاكتاميز	رقم العزلة	انتاج انزيم البيتالاكتاميز	رقم العزلة	انتاج انزيم البيتالاكتاميز	رقم العزلة	انتاج انزيم البيتالاكتاميز
PU1	+++	PU21	_	PE٤١	+++	PW61	_

_	PW62	_	PE42	_	PU٢٢	+	PU2
+	PW63	_	PE٤٣	_	PU23	_	PU٣
+++	PW64	_	PE44	_	PU٢٤	_	PU٤
++	PB65	_	PE45	+++	PU25	++	PU٥
++	PB66	_	PE46	+++	PU26	_	PU٦
+++	PB67	+++	PE47	-	PU٢٧	+	PU٧
_	PB68	_	PE48	++	PU28	_	PU٨
-	PB69	+	PE49	-	PU٢٩	_	PU٩
++	PB70	_	PE50	-	PU30	+++	PU١٠
+++	PB71	+	PW51	_	PU٣١	_	PU11
+++	PB72	++	PW52	+++	PE32	_	PU١٢
++	PB73	_	PW53	++	PE٣٣	_	PU1٣
+++	PB74	++	PW54	++	PE34	+++	PU١٤
_	PB75	++	PW55	++	PE٣٥	_	PU15
+	E.coli ATCC10536	_	PW56	++	PE36	_	PU١٦
		_	PW57	+	PE٣٧	+	PU17
_	P.aeruginosa ATCC154427	_	*PW58*	_	PE38	_	PU١٨
		_	PW59	++	PE٣٩	_	PU١٩
		+	PW60	_	PE40	++	PU20

+++ نتيجة موجبة خلال اقل من دقيقة

_ نتيجة سالبة **++ نتيجة موجبة خلال ١-٥ دقائق**

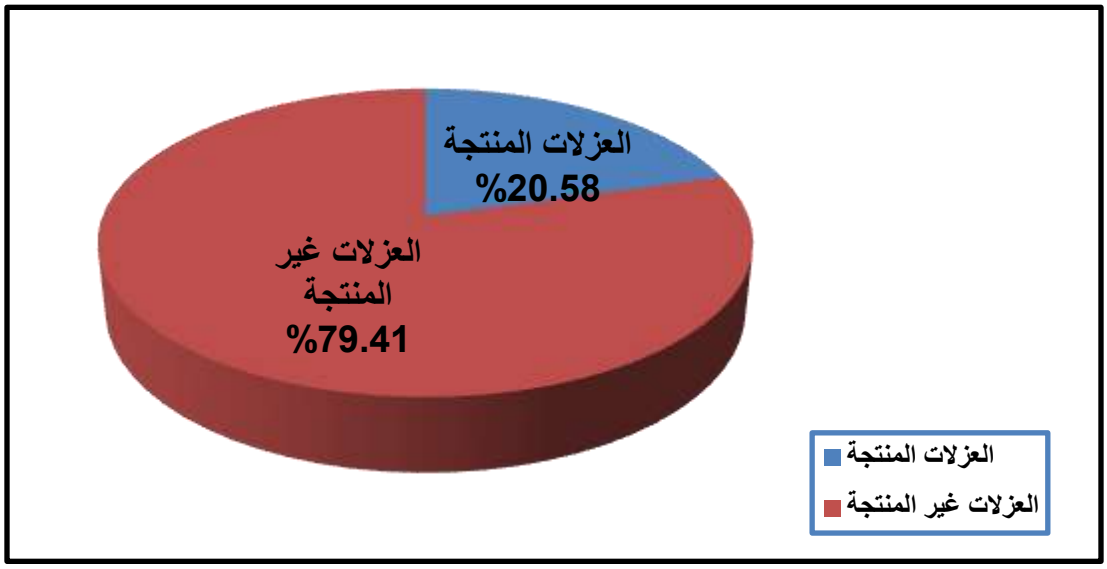
٨- التحري عن انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف 4

Detection of Extended Spectrum β-lactamase enzymes

أستخدمت في هذه الدراسة طريقة الأقراص المتاخمة Disk Approximation للتحري عن أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف Extended Spectrum β-lactamase) ESBLs(، وهي من الطرائق السهلة والدقيقة ، وتعد النتيجة موجبة عند حدوث اتساع في منطقة التثبيط بين القرص المركزي الحاوي على خليط الاموكزاسلين / حامض الكلافيولنك مع واحد او اكثر من

، إذ أشار الباحث Ceftazidime , Cefotaxime, Piperacillinالمضادات الاخرى امثال وزملاؤه (٢٠٠٢) الى فعالية هذه الطريقة في تشخيص العزلات المنتجة لانزيمات Bonfiglio البيتالاكتاميز واسعة الطيف بالاضافة الى اجراء فحص الحساسية للمضادات الحيوية.

أخضعت جميع العزلات قيد الدراسة المنتجة لانزيمات البيتالاكتاميز والتي بلغ عددها (٣٤) عزلة للكشف عن انتاجها لانزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف وقد اشارت النتائج الى ان (٧) عزلات من مجموع (٣٤) عزلة اعطت نتيجة موجبة لاختبار انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف (ESBLs-٤، 4-9) شكل (٤-8 أي بنسبة (٢٠,٥٨٪) ، جدول (٤-١٠) ، وجاءت نتائج هذه الدراسة مقاربة لما توصل اليه Strateva وزملاؤه (٢٠٠٧) الذين اشاروا الى ان إنتاج بكتريا *P.aeruginosa* لانزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف بنسبة (٢٦,٣٪) من خلال دراسة اجروها Alipour وجماعته (٢٠١٠) ان *P.aeruginosa* المعزولة من عدد من مستشفيات ايران منتجة (٣٠٪) من عزلات بكتريا لانزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف وذلك من خلال دراستهم على (٣٥٠) عزلة بكتيرية . وأشار الباحث Winokur,2001 ان تشفير هذه الانزيمات يكون بوساطة بلازميدات كبيرة الحجم (تتراوح بين (٨٠-٣٠٠) كيلو زوج قاعدة تنتقل بين الانواع البكتيرية المختلفة ، وفضلاً عن ذلك فإنها تحمل جينات تشفر الى مقاومة مضادات بيتالاكتام اخرى .



شكل(٤-٩) النسبة المئوية للعزلات المنتجة وغير المنتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف



شكل (٤-١٠) أنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف للعزلة المحلية *P.aeruginosa*

١.مضاد الأموكزاسلين / كلافيولنك ٣.مضاد السيفوتاكسيم

٢. مضاد السيفتازديم ٤. مضاد البيراسلين

جدول (٤-٨) قابلية عزلات *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة محليا"على انتاج أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف (Extended – spectrum β -Lactamase ESβLs)

رقم العزلة	انتاج انزيمات واسعة الطيف	رقم العزلة	انتاج انزيمات واسعة الطيف
PU1	_	PE41	+
PU5	_	PE47	+
PU7	_	PW51	_
PU10	+	PW52	_
PU14	_	PW54	_
PU17	_	PW55	_
PU20	+	PW60	_
PU25	_	PW63	_
PU26	_	PW64	+
PE28	_	PW65	_

PE32	_	PW66	_
PE33	_	PW67	_
PE34	_	PB70	_
PE35	_	PB71	+
PE36	_	PB72	_
PE37	+	PB73	_
PE39	_	PB74	_

- عزلات غير منتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف
عزلات منتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف +

٤-٩ تحديد التراكيز المثبطة الدنيا لعدد من المضادات الحيوية

٤-٩-١ بدون وجود المثبطات

) لبعض المضادات الحيوية التي اختيرت كونها M.I.Cتم تحديد التركيز المثبط الادنى (
) لمعالجة الالتهابات المختلفة التي تسببها Drug of choiceتمثل المضادات الاكثر استعمالاً (
في مستشفياتنا، أخضعت جميع العزلات المنتجة لانزيمات البيتالاكتاميز *P.aeruginosa* بكتريا
، Ampicillin(٣٤) عزلة لهذا الفحص ، تم إختبار هذه العزلات تجاه (١١) مضاد حيوياً وهي
Amoxicillin ،Carbencillin،Cephalexin ،Cefotaxime ، Ceftriaxone ،Ceftazidime
Break، اعتمدت نقطة التوقف (Amikacin، Gentamicin ،Ciprofloxacin ،Piperacillin
) كأساس لحساب الاستجابة وتعرف بإنها التركيز NCCLs,2002) الموصوفة من قبل (point
الامثل الذي يمكن ان يصله المضاد في المصل بحيث يوفر اعلى حد للمعالجة ، يعد الكائن مستجيباً
) المحسوبة أقل من نقطة التوقف ، واستخدمت طريقةM.I.C) عندما تكون مقادير (Susceptible(
التراكيز المضاعفة المتسلسلة في وسط اكار مولر هنتون لاجراء هذا الاختبار، لكون مكونات
) المحسوبة اذ تؤثر تأثيراً واضحاًM.I.Cالوسط المستعمل تعد من العوامل المؤثرة على نتائج قيم (
المحسوبة لذلك يفضل إستخدام أكار مولر هنتون لاحتوائه على كمية قليلة من M.I.Cعلى مقادير
Stocks & (كلوريد الصوديوم ، ونسب قليلة من أيونات الكالسيوم والمغنيسيوم
Ridgway,1987.)

) الى ان العزلات قيد الدراسة 9تشير نتائج الدراسة الحالية وكما موضح في الجدول (٤-
تراوحت ما بين (٥١٢-١٠٢٤) Amoxicillin و Ampicillin جميعها ابدت مقاومة لمضادات
وزملاؤه (٢٠١٠) إذ كانت Abdullahمكغم/مل ، وهذه النتائج جاءت مقاربة الى ما توصل اليه
Poirel *et*) لها (١٢٨-١٠٢٤<) وان نتائجنا ايضاً كانت مطابقة الى ما توصل اليه (M.I.Cقيم (
كانت مقاومة ١٠٠٪، يلاحظ من النتائج بإن *P.aeruginosa*) من ان جميع عزلات 2000,*al.*
العزلات أظهرت مقاومة مشتركة لمضادي الامبسلين والاموكزاسلين بتراكيز بلغت أضعاف نقاط

التوقف ، وهذا وارد لان بمقدور الانزيمات المحطمة للامبسيلين ان تعمل بالكفاءة نفسها على تحطيم الاموكزاسلين لان المضادين يعودان الى مجموعة واحدة (Atlas,1995)، وكذلك الاستخدام الشائع والمتداول بكثرة لهذين المضادين .

فقد استطاعت (٢٠) عزلة مقاومة المضاد Piperacillin أما بالنسبة لمضاد الببراسلين بتركيز تراوح بين (٢٥٦-٥١٢)مكغم/ مل وبالرغم من ان النتائج تشير الى ان فعالية الببراسلين أعلى من فعالية مجموعة الامينوبنسلين لكن مع هذا فإن النتائج تدل *P.aeruginosa* ضد بكتريا على وجود مقاومة لهذا المضاد بالرغم من دخوله الحديث للعلاج في العراق وربما يعزى السبب في ذلك الى امتلاك هذه البكتريا انزيمات تعمل على تحطيم مضاد الببراسلين، وكذلك يعود السبب في ذلك الى كثرة استعمال هذا المضاد في مستشفياتنا .

اما بالنسبة الى مضاد الـ Carbencillin فقد تراوحت قيم M.I.C له ما بين (٦٤-١٠٢٤)، فقد اشار بمقدورها TEM (١٩٨٥) الى ان السلالات البكتيرية المنتجة لانزيمات البيتالاكتاميز نوع Neu تحطيم مضاد الكاربنسلين فضلاً عن الببراسيلين وربما يفسر هذا السبب المقاومة لمضاد الكاربنسلين والببرسلين.

بلغت قيمة التركيز المثبط الادنى M.I.C لمضادات Cephalexin ،Cefotaxime ، (١٢٨-١٠٢٤)، (١٦-١٠٢٤)، (١٦-١٠٢٤) مكغم /مل، على التوالي، اما قيم Ceftriaxon فكانت (٨-٥١٢) مكغم/مل، جاءت نتائج هذه Ceftazidime لمضاد M.I.C التركيز المثبط الادنى لمضاد M.I.C وزملاؤه (٢٠١٠) الذين اظهروا ان قيم Abdullah الدراسة مقاربة لما توصل اليه وزملاؤه (٢٠١٠) في Du تراوحت بين (٨-١٠٢٤)مكغم/مل ، بينما أشار Cefotaxime بأن قيم Ceftazidime دراستهم على جراثيم الزوائف الزنجارية في تايوان ، باستخدام مضاد تتراوح بين (٤-٢٥٦) مكغم/مل، ويعزى سبب ارتفاع المقاومة لمضادات السيفالوسبورينات M.I.C الى الانتاج العالي لانزيمات البيتالاكتاميز الكروموسومية والبلازميدية معاً او لأنخفاض تجميع الدواء بوساطة الجدار وانظمة الدفق التي تمتلكها بكتريا *P.aeruginosa*)، وقد يعزى سبب المقاومة الى الضغط المستمر لاستعمال المضاد والذي Livermore(٢٠٠٠, ينتج عنه تطور صفة المقاومة سيما عن طريق موقع الهدف او عن طريق أنظمة الدفق وكل هذه الميكانيكيات يشفر لها كروموسومياً (Ruiz ,.٢٠٠٣).

أما بالنسبة لمضادات مجموعة الامينوكلايكوسيدات Aminoglycosides فقد بلغت قيمة (٤-٢٥٦) مكغم/مل ، Amikacin (٢-١٠٢٤)مكغم/مل ، ولمضاد Gentamicin لمضاد M.I.C وزملاؤه (٢٠١٠) الذين بينوا ان قيم Abdullah جاءت نتائج هذه الدراسة مقاربة لما توصل اليه كانت منخفضة فقد تراوحت (٤-١٢٨) مكغم/مل.Amikacin لمضاد M.I.C

أما مضاد Ciprofloxacin فقد كانت قيم التركيز المثبط الادنى له (١-٦٤) مكغم/مل ، وقد بينت الدراسة الحالية ان هنالك مقاومة منخفضة لهذا المضاد من قبل جراثيم الزوائف الزنجارية ، منخفضة لمضاد M.I.C وقد أتفقت هذه النتائج مع العبيدي (٢٠٠٢) التي بينت ان قيم وزملاؤه (٢٠١٠)إلى Abdullah والتي بلغت (٠,٥-٦٤)مكغم/مل ، فيما أشار Ciprofloxacin

كانت (١-١٦)مكغم/مل في دراستهم على جراثيم الزوائف Ciprofloxacin لمضاد M.I.Cان قيم الزنجارية .

Drug of Choice لبعض المضادات الحيوية المستخدمة M. I .C) قيم 9جدول (٤-
***Pseudomonas aeruginosa*في علاج الألتهابات المتسببة عن بكتريا**

Amikacin	Gentamicin	Ciprofloxacin	Pipracillin	Ceftazidime	Ceftriaxone	Cefotaxime	Cephalexin	Carbenicillin	Amoxicillin	Ampicillin	المضاد / رقم العزلة
٣٢≥	٨≥	٤≥	١٢٨≥	٣٢≥	٣٢≥	٣٢≥	٣٢≥	١٢٨≥	٣٢≥	٣٢≥	نقاط التوقف $\mu g/ml^{-1}$
16	32	2	64	16	32	256	512	1024	1024	٥١٢	PU1
4	2	1	256	128	128	32	128	٥١٢	٥١٢	٥١٢	PU5
16	4	2	32	16	64	512	١٠٢٤	١٠٢٤	١٠٢٤	١٠٢٤	PU7
128	16	32	512	256	512	512	١٠٢٤	١٠٢٤	١٠٢٤	1024	PU10
16	2	1	128	128	128	128	1024	1024	1024	512	PU14
4	4	4	256	256	256	256	٥١٢	٥١٢	٥١٢	٥١٢	PU17
256	128	64	512	512	512	512	512	512	١٠٢٤	1024	PU20
4	2	2	128	128	256	256	256	512	512	١٠٢٤	PU25
4	16	2	256	256	٥١٢	٥١٢	٥١٢	٥١٢	٥١٢	٥١٢	PU26
16	64	2	64	16	16	512	١٠٢٤	١٠٢٤	١٠٢٤	١٠٢٤	PE28
64	4	8	256	64	64	16	١٠٢٤	١٠٢٤	١٠٢٤	١٠٢٤	PE32
16	4	2	32	32	32	32	512	512	512	512	PE33
4	16	16	64	128	512	512	512	512	١٠٢٤	١٠٢٤	PE34
8	4	2	64	16	16	512	512	512	512	1024	PE35
16	128	2	256	16	128	256	1024	1024	1024	٥١٢	PE36
64	1024	32	256	512	16	16	512	64	512	٢٥٦	PE37
16	4	2	512	16	512	512	١٠٢٤	١٠٢٤	١٠٢٤	١٠٢٤	PE39
256	512	32	512	512	512	512	512	1024	1024	512	PE41
128	256	64	512	256	١٠٢٤	١٠٢٤	١٠٢٤	١٠٢٤	١٠٢٤	1024	PE47

PW51	٥١٢	٥١٢	٥١٢	256	256	16	64	2	2	16
PW52	512	٥١٢	128	128	16	16	32	1	4	8
PW54	512	512	512	512	512	64	512	64	16	128
PW55	1024	1024	1024	256	256	16	32	2	32	128
PW60	512	٥١٢	٥١٢	٥١٢	٥١٢	8	64	2	4	8
PW63	512	٥١٢	256	256	256	256	256	2	2	16
PW64	1024	١٠٢٤	١٠٢٤	١٠٢٤	١٠٢٤	128	512	2	256	128
PW65	1024	١٠٢٤	512	32	32	16	64	8	4	8
PW66	1024	١٠٢٤	١٠٢٤	١٠٢٤	١٠٢٤	128	256	1	2	4
PW67	1024	١٠٢٤	512	512	512	512	512	2	16	4
PB70	1024	١٠٢٤	١٠٢٤	١٠٢٤	١٠٢٤	256	256	16	2	16
PB71	1024	١٠٢٤	١٠٢٤	512	512	512	512	2	512	64
PB72	512	512	512	512	512	16	64	2	128	4
PB73	1024	1024	1024	512	512	128	256	2	4	8
PB74	1024	١٠٢٤	256	256	16	16	256	2	2	4

٢-٩- تحديد التراكيز المثبطة الدنيا بوجود مثبطات انزيمات البيتالاكتاميز 4

تم تحديد التراكيز المثبطة الدنيا (M.I.C) للمضادات الحيوية بوجود مثبطات أنزيمات البيتالاكتاميز لمعرفة تأثير الفعل الخلطي لمثبطات انزيمات البيتالاكتاميز مع مضادات اليبتالاكتام في هذه الدراسة وهي Ampicillin، Amoxycillin، Cephalexin، Carbencillin ، اذ تم مزج المضاد مع المثبط Ceftazidime، Ceftriaxone، Cefotaxime، Piperacillin ، كما استخدم الببراسلين/ تازوبكتام (Tazocin) المحضر تجارياً حامض الكلافيولنك بنسبة ١: ٤ وبنسبة خلط ٢: ١ Sulba) وبنسبة ١: ٨ وكذلك مضاد الامبسلين/ سلباكتام المحضر تجارياً باسم (Augmentin) وبنسبة ٢: ١. وكذلك الاموكزاسلين / حامض الكلافيولنك المعروف (

) النسب المئوية للتأثير الخلطي لمثبطات البيتالاكتاميز / المضاد10جدول (٤-

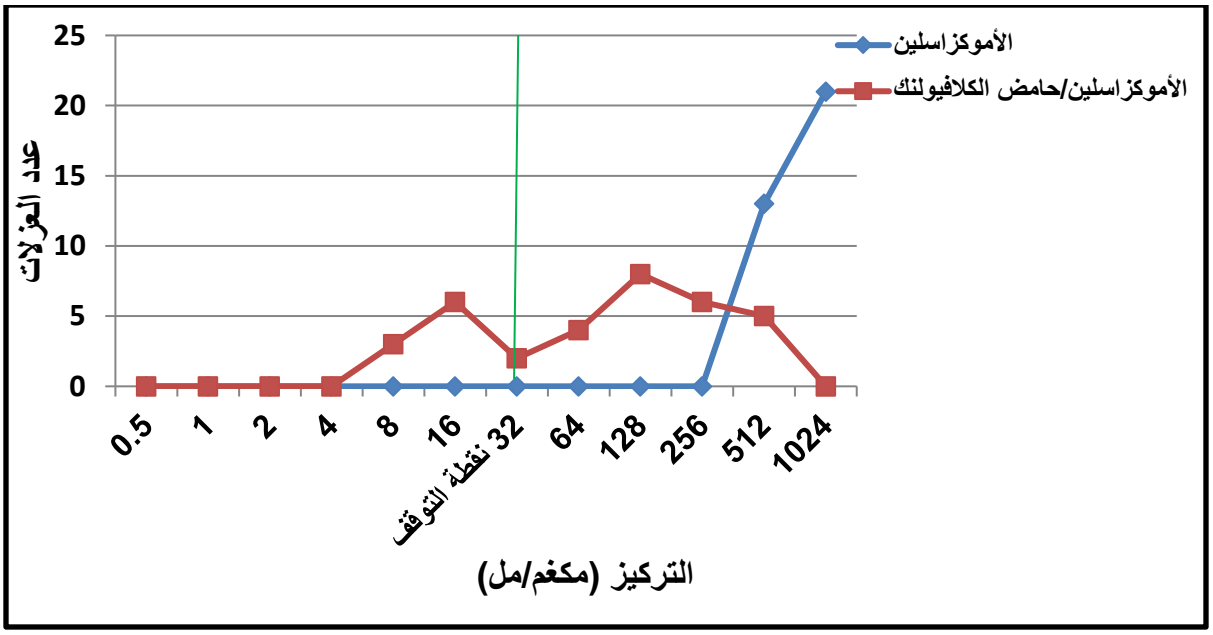
على حساسية عزلات بكتريا Pseudomonas aeruginosa للمضادات الحيوية

المضاد المثبط	نسبة العزلات الحساسة) % (	نسبة العزلات المقاومة) % (
Ampicillin	0	100
Ampicillin / Sulbactam	٠	١٠٠
Amoxicillin	0	100
Amoxicillin / Clavulanic acid	26.47	73.52
Carbenicillin	5.88	94.11
Carbenicillin / Clavulanic acid	41.17	58.82
Cephalexin	0	100
Cephalexin / Clavulanic acid	32.35	67.64
Cefotaxim	17.64	82.35
Cefotaxim / Clavulanic acid	73.52	26.47
Ceftriaxone	23.52	76.47
Ceftriaxone/ Clavulanic acid	79.41	20.58
Ceftazidime	41.17	58.82
Ceftazidime/ Clavulanic acid	100	0
Pipracillin	35.29	64.70
Pipracillin / Clavulanic acid	85.29	14.70
Pipracillin / Tozabactam	91.17	8.82

٤-٩-٢-١ السلباكتام/ الامبسلين Ampicillin/Sulbactam

تشير نتائج الدراسة الحالية الى ان جميع العزلات الخاضعة للدراسة والبالغ عددها (٣٤) عزلة) وبإستخدام توليفة المضاد مع مثبط 10كانت مقاومة لمضاد الأمبسلين اي بنسبة ١٠٠٪ جدول (٤- بدرجة قليلة وبقيت جميع العزلات مقاومة ، تدلل هذه النتيجة على M.I.Cالسلباكتام تراجعت قيم) بين المضاد والمثبط بعد خلطهما . يعرف Synergestic effectعدم وجود تأثير تآزري (لمضادات البيتالاكتام بمقدار اربع M.I.C) بأنه اختزال او تناقص في قيم Synergismالتآزر (لمضادات البيتالاكتام M.I.Cمرات أو أكثر عند أستخدام المثبط مخلوطاً معها ، مقارنةً مع قيم بمفردها.

أما **٤-٩-٢-٢ حامض الكلافيولنك/الأموكزاسلين Amoxicillin/Clavulanic acid** بالنسبة لتوليفة مضاد الأموكزاسلين وحامض الكلافيولنك أستخدمت النسبة التجارية بالدواء) وهي نسبة ١:٢ مضاد الى مثبط ، تشير نتائج الدراسة Augmentinالمحضر المعروف بأسم ( ) 10الحالية الى ان جميع العزلات كانت مقاومة لمضاد الأموكزاسلين أي بنسبة ١٠٠٪ جدول (٤-) وأصبح عدد العزلات الحساسة (٩) 11 شكل (٤- M.I.Cوبأستخدام هذه التوليفة تراجعت قيم عند مستوى معنوية tإذ لوحظت فروق معنوية عند تطبيق أختبار عزلة أي بنسبة ٢٦,٤٧٪ ، M.I.C) ، تدلل هذه النتيجة على وجود تأثير تآزري واضح في تقليل قيم 11(١٪،٥٪) جدول (٤- وزملاؤه (٢٠٠٧) إلى ان نسبة العزلات AlAfifi) ، واشار 4لمضاد الأموكزاسلين ملحق (الحساسة لمضاد الأموكزاسلين بعد خلطه مع حامض الكلافيولنك هي ٢٠٪ في دراسةٍ أجروها على بكتريا الزوائف الزنجارية المعزولة من مصادر سريرية مختلفة في بعض مستشفيات فلسطين ، كما الى ان خلط مضاد الأموكزاسلين مع مثبط حامض Abdulkhair (2011) و Al Sahli أشار المعزولة من مرضى مصابين *P.aeruginosa*الكلافيولنك قد زاد من حساسية عزلات بكتريا بألتهابات المجاري البولية في المملكة العربية السعودية ، إذ بينوا ان خليط حامض الكلافيولنك يستطيع ان يثبط نمو) ١٢٥ μgml^{-1} ١٢٨) مع مضاد الأموكزاسلين بتركيز(mgL^{-1}بتركيز (الى اوطأ التراكيز.*P.aeruginosa*بكتريا



) التأثير التآزري لمضاد الأموكزاسلين و حامض الكلافيولنك ضد عزلات بكتريا 11شكل (٤-

Pseudomonas aeruginosa

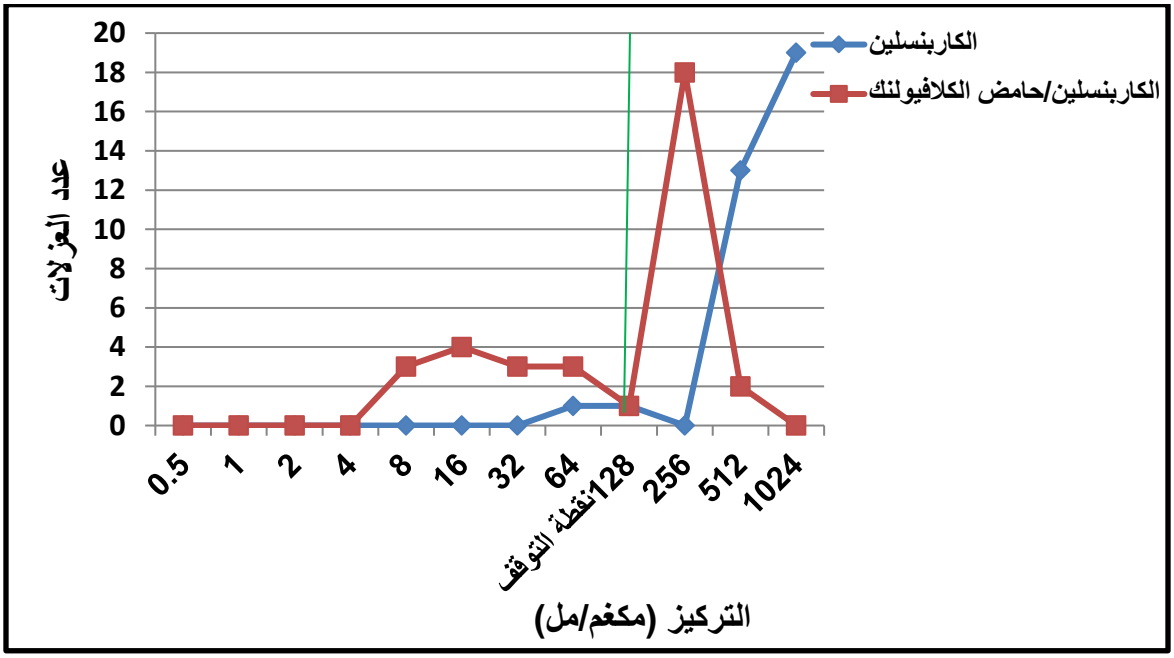
عند Amoxicillin/Clavulanicacid و Amoxicillin يوضح القيمة التائية بين)1(٤-١ جدول
مستوى الدلالة ٥٪ ، ١٪.

التأثير	حجم العينة N	المتوسط الحسابي Mean	الأنحراف المعياري S.D	درجة الحرية df	القيمة التائية t		مستوى الدلالة
					المحسوبة	الجدولية	
Amoxicillin	34	828.24	252.554	33	18.666**	1.96	٠,٠٥
Amoxicillin+Clavulanic acid	34	163.53	169.307			2.576	٠,٠١

* - معنوي عند مستوى الدلالة ٠,٠٥ ** - عالي المعنوية عند مستوى الدلالة ٠,٠١

تم **٤-٩-٢-٣ حامض الكلافيولنك/الكاربنسلين Carbencillin/Clavulanic acid**
خلط مضاد الكاربنسلين مع حامض الكلافيولنك بنسبة ٤:١ و أظهرت النتائج انخفاض في قيم) وتشير نتائج التحليل الأحصائي عند تطبيق 6) ملحق (12 للعزلات قيد الدراسة شكل (٤-M.I.C) فبعد ان كانت 12 الى أن هنالك فروقاً معنوية عند مستوى معنوية (١٪،٥٪) جدول (٤-tأختبار) أزداد عدد العزلات ليصل الى (١٤) عزلة أي 10عزلتان حساستان اي بنسبة ٥,٨٨٪ جدول (٤- بنسبة ٤١,١٧٪ ، تتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه الطائي (٢٠٠٥) من ان معظم عزلات بكتريا

تجاه مضاد الكاربنسلين عند خلطه مع M.I.C الخاضعة لدراسته قد إنخفض *Proteus mirabilis*
مثبط حامض الكلافيولنك .



) التأثير التآزري لمضاد الكاربنسلين و حامض الكلافيولنك ضد عزلات 12شكل(٤-
***Pseudomonas aeruginosa*بكتريا**

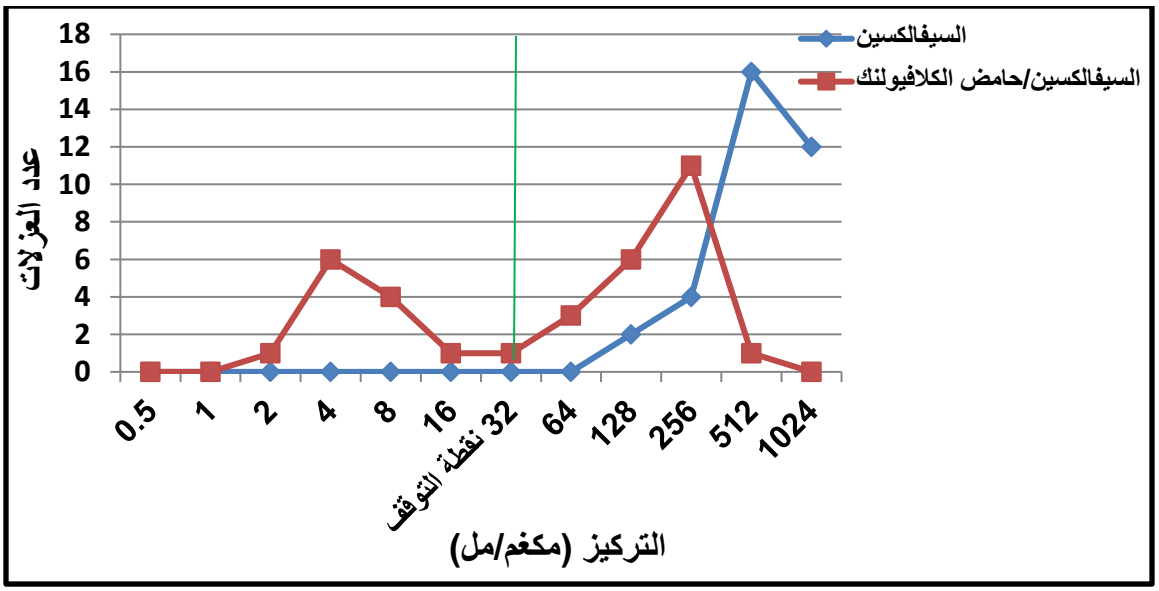
وCarbencillin) يوضح القيمة التائية بين 12جدول (٤-
عند مستوى الدلالة ٥٪ ، ١٪Clavulanic acid/ Carbencillin

التأثير	حجم العينة N	المتوسط الحسابي Mean	الأنحراف المعياري S.D	درجة الحرية df	القيمة التائية t		مستوى الدلالة
					المحسوبة	الجدولية	
Carbencillin	34	773.65	301.576	33	14.088**	1.96	٠,٠٥
Carbencillin+Clavulanic acid	34	180.47	138.118			2.576	٠,٠١

** - عالي المعنوية عند مستوى الدلالة ٠,٠١ * - معنوي عند مستوى الدلالة ٠,٠٥

أما **Cephalexin/Clavulanic acid** **٤-٩-٢-٤حامض الكلافيولنك/السيفالكسين**

بالنسبة لمضادات البيتالاكتام العائدة لمجموعة السيفالوسبورينات المخلوطة مع حامض الكلافيولنك بعد الخلط M.I.C، فقد أظهرت النتائج لمضاد السيفالكسين فروقاً معنوية أدت الى انخفاض في قيم) 5) ملحق (13) شكل (٤-13مع حامض الكلافيولنك عند مستوى معنوية (١٪،٥٪) جدول (٤-(١١) عزلة أصبح عدد العزلات الحساسة فبعد ان كانت جميع العزلات مقاومة له أي بنسبة ١٠٠٪).10أي بنسبة ٣٢,٣٥٪ جدول(٤-



) التأثير التآزري لمضاد السيفالكسين و حامض الكلافيولنك ضد عزلات بكتريا 13شكل (٤-

Pseudomonas aeruginosa

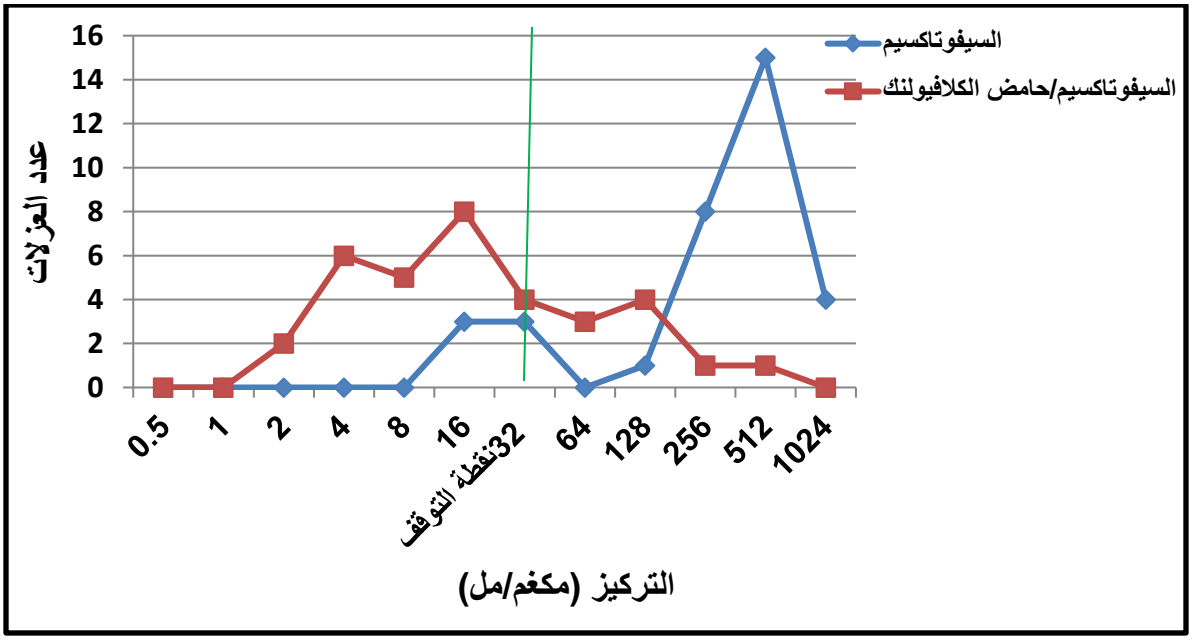
وCephalexin)يوضح القيمة التائية بين 13جدول (٤-

عند مستوى الدلالة ٥٪ ، ١٪Clavulanic acid/ Cephalexin

التأثير	حجم العينة N	المتوسط الحسابي Mean	الأنحراف المعياري S.D	درجة الحرية df	القيمة التائية t		مستوى الدلالة
					المحسوبة	الجدولية	
Cephalexin	34	640.00	308.748	33	12.120**	1.96	٠,٠٥
Cephalexin+Clavulanic acid	34	129.24	126.420			2.576	٠,٠١

** - عالي المعنوية عند مستوى الدلالة ٠,٠١ * - معنوي عند مستوى الدلالة ٠,٠٥

أما **٤-٩-٢-٥حامض الكلافيولنك/السيفوتاكسيم Cefotaxim/Clavulanic acid** فيما يخص توليفة السيفوتاكسيم مع حامض الكلافيولنك فقد اوضحت نتائج الدراسة الحالية وكما بإن للمثبط تأثيراً معنوياً فقد تمكن من 4-14،10) جدول (٤-7) ملحق (14موضح في شكل (٤-) إرجاع فعالية المضاد عند مستوى معنوية (١٪،٥٪) بحيث عادت بعض العزلات الى المدى الحساس إذ أصبح عدد العزلات الحساسة (٢٥) عزلة أي بنسبة ٧٣,٥٢٪ بعد أن كانت (٦) عزلات أي بنسبة حساسية ١٧,٦٤٪ ، تتفق هذه النتائج مع ما توصلت اليه Al-Khaffash (١٩٩٩) أن مضادات السيفالوسبورينات مع توليفة حامض الكلافيولنك تمكنت من إرجاع قيم M.I.C للعزلات المقاومة الى المدى الحساس ، بينما أشار Abdul-Razak (٢٠٠٠) الى أن هذه التوليفة لم تتمكن من إرجاع قيم M.I.C لكل العزلات أذ بقيت بعضها مقاومة ضمن مدى نقطة التوقف (Break point) ، وقد يعزى السبب في ذلك الى إختلاف نوعية العزلات المستخدمة في البحث .



) التأثير التآزري لمضاد السيفوتاكسيم و حامض الكلافيولنك ضد عزلات بكتريا 14شكل (٤-
Pseudomonas aeruginosa

وCefotaxime)يوضح القيمة التائية بين 14جدول (٤-

عند مستوى الدلالة ٥٪ ، ١٪Clavulanic acid/ Cefotaxime

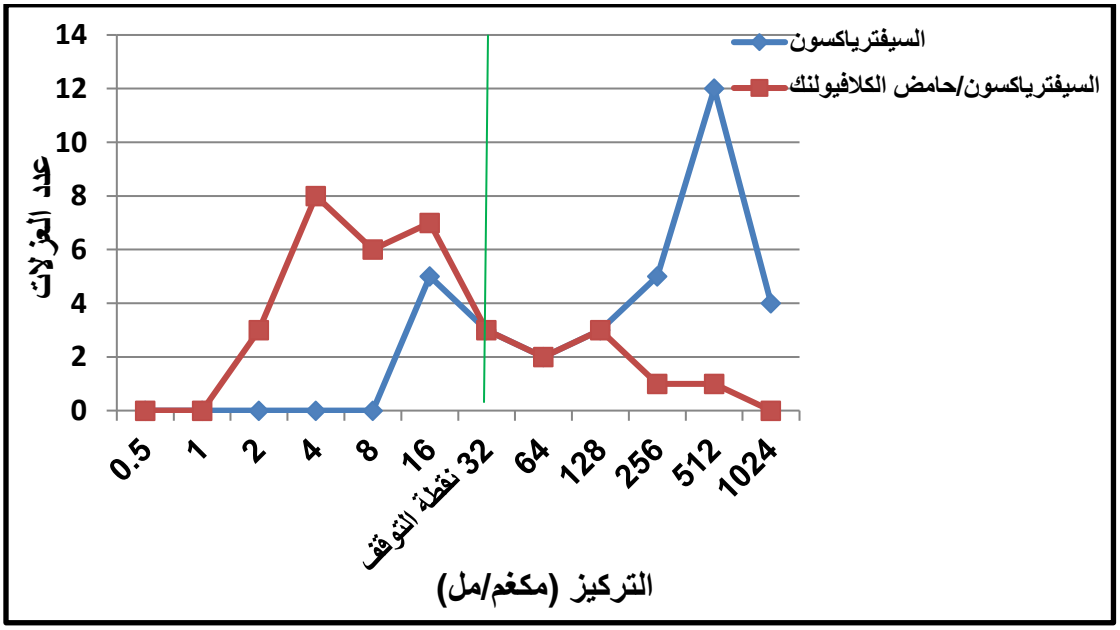
التأثير	حجم	المتوسط	الأنحراف	درجة	القيمة التائية t	مستو

	العينة N	ط الحسابي Mean	المعياري S.D	الحرية df	المحسوبة	الجدولية	ى الدلالة
Cefotaxime	34	414.54	292.686	33	8.241**	1.96	٠,٠٥
Cefotaxime+Clavulanic acid	34	52.82	98.042			2.576	٠,٠١

** - عالي المعنوية عند مستوى الدلالة ٠,٠١ * - معنوي عند مستوى الدلالة ٠,٠٥

أما **4-٢-٩-6 حامض الكلافيولنك/السيفترياكسون Ceftriaxon/Clavulanic acid**

بالنسبة لتوليفة السيفترياكسون مع حامض الكلافيولنك فقد أوضحت نتائج الدراسة الحالية عند تطبيق أختبار t في قيم إنخفاض في تمثلت (١٪،٥٪) معنوية عند مستوى معنوية ان هنالك فروقا)، فبعد أن كانت (٨) عزلات 15) جدول (٤-8( ) ملحق15 للعزلات قيد الدراسة شكل (٤- M.I.C) أزداد عدد العزلات الحساسة ليصل الى (٢٧) عزلة أي10حساسة أي بنسبة ٢٣,٥٢٪ جدول (٤- بنسبة ٧٩,٤١٪ .



) التأثير التآزري لمضاد السيفترياكسون وحامض الكلافيولنك ضد عزلات بكتريا 15شكل (٤-

Pseudomonas aeruginosa

وCeftriaxone) يوضح القيمة التائية بين 15جدول (٤-

عند مستوى الدلالة ٥٪ ، ١٪Clavulanic acid/ Ceftriaxone

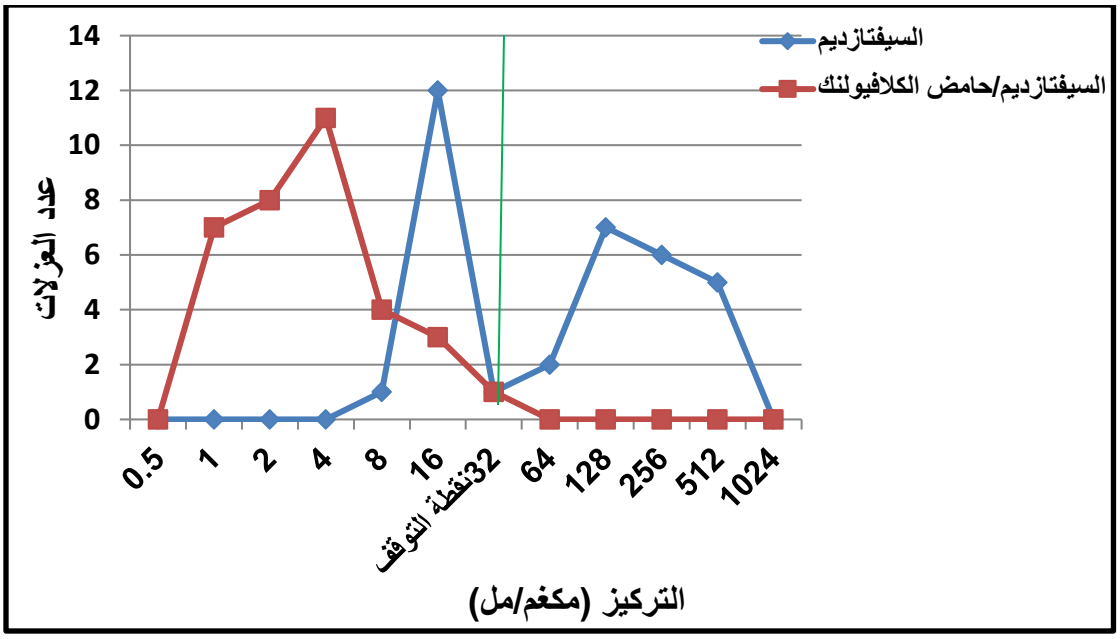
التأثير	حجم	المتوسط	الأنحراف	درجة	القيمة التائية t	مستو

	العينة N	المتوسط الحسابي Mean	المعياري S.D	الحرية df	المحسوبة	الجدولية	مستوى الدلالة
Ceftriaxone	34	359.06	318.425	33	6.542**	1.96	٠,٠٥
Ceftriaxone+Clavulanic acid	34	46.29	98.095			2.576	٠,٠١

** - عالي المعنوية عند مستوى الدلالة ٠,٠١ * - معنوي عند مستوى الدلالة ٠,٠٥

7-٩-٢-4 حامض الكلافيولنك/السيفتازديم Ceftazidim/Clavulanic acid

أظهرت نتائج الدراسة الحالية فروقاً معنوية واضحة إذ أن جميع العزلات أصبحت حساسة لمضاد السيفتازديم أي بنسبة ١٠٠٪ بعد أن كانت نسبة العزلات الحساسة ٤١,١٧٪ عند خلطه مع حامض الكلافيولنك عند مستوى معنوية (١٪،٥٪) وإنخفاض قيمة M.I.C (٠,٥) الى حد وصل (٤-10،16) وجدول (٤-16) شكل (٤-9مكغم/مل ، ملحق (وزملاؤه Poirel) ، كما أشار تجاهM.I.C الخاضعة لدراستهم قد أنخفض *P.aeruginosa*(٢٠٠١) من أن معظم عزلات بكتريا مضاد السيفتازديم عند خلطه مع حامض الكلافيولنك في دراستهم على بكتريا الزوائف الزنجارية المعزولة من بعض مستشفيات الكويت ، إذ أثبتوا ان هناك تأثيراً تآزرياً عند خلط المضاد مع المثبط وزملاؤه (٢٠٠٦) في البرازيل على بكتريا الزوائف الزنجارية Pellegrino، وفي دراسة أجراها وجدوا أن أستخدام خليط مضاد السيفتازديم / حامض الكلافيولنك كان له فعالية عالية ضد العزلات تجاه السيفتازديم وعادت غالبية العزلات الى المدى الحساس .M.I.Cمما أدى الى خفض



) التأثير التآزري لمضاد السيفتازديم وحامض الكلافيولنك ضد عزلات بكتريا 16شكل (٤-

Pseudomonas aeruginosa

Ceftazidimeيوضح القيمة التائية بين)16جدول (٤-

عند مستوى الدلالة ٥٪ ، ١٪Clavulanic acid/ Ceftazidime و

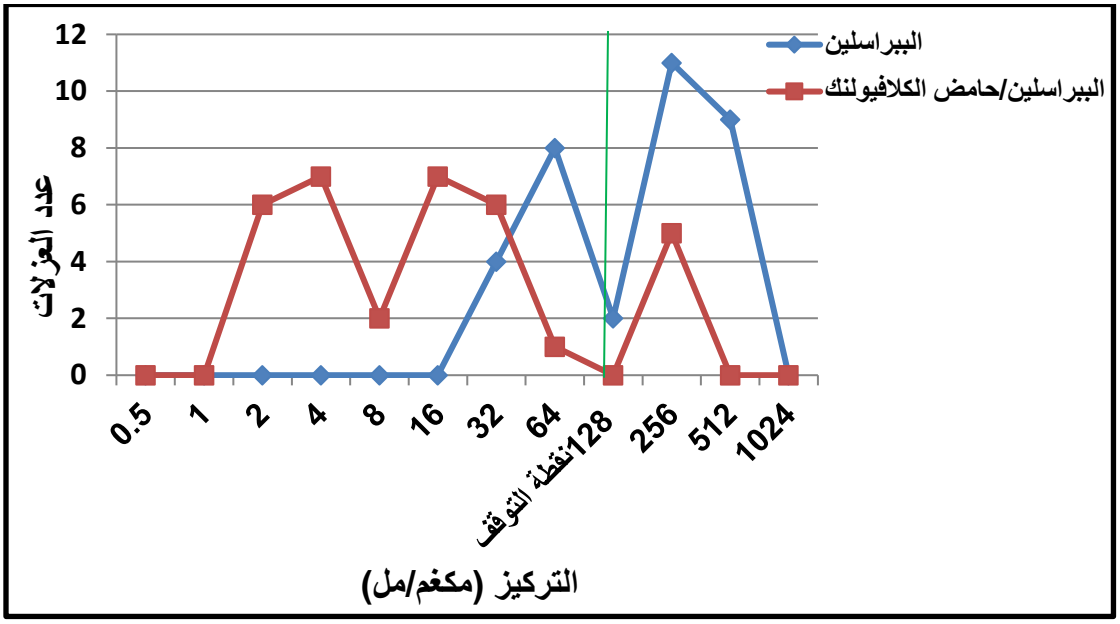
التأثير	حجم العينة N	المتوسط الحسابي Mean	الأنحراف المعياري S.D	درجة الحرية Df	القيمة التائية t		مستوى الدلالة
					المحسوبة	الجدولية	
Ceftazidime	34	157.41	5.26	33	5.151**	1.96	٠,٠٥
Ceftazidime+Clavulanic acid	34	173.075	6.326			2.576	٠,٠١

** - عالي المعنوية عند مستوى الدلالة ٠,٠١ * - معنوي عند مستوى الدلالة ٠,٠٥

Pipracillin/Clavulanic acid حامض الكلافيولنك/البيراسلين8-٩-٢-٤-

أما فيما يخص توليفة البيراسلين مع حامض الكلافيولنك فقد أوضحت نتائج الدراسة الحالية) بأن المثبط تمكن 17،٤-10) جدول (٤-10) ملحق (17فروقاً معنوية وكما موضح في الشكل (٤-
من أرجاع فعالية المضاد عند مستوى معنوية (١٪،٥٪) بحيث عادت بعض العزلات الى المدى الحساس أذ أصبح عدد العزلات الحساسة (٢٩) عزلة أي بنسبة ٨٥,٢٩٪ بعد أن كانت (١٢) عزلة

وزملاؤه (٢٠٠٠) من ان خلط Rokosأي بنسبة ٣٥,٢٩٪ وهذه النتيجة مقاربة لما توصل اليه البيراسلين مع الكلافيولنك قد تحسست له السلالات السالبة لصبغة غرام بنسبة تزيد على (٩٠٪) .



) التأثير التآزري لمضاد البيراسلين وحامض الكلافيولنك ضد عزلات بكتريا 17شكل (٤-

Pseudomonas aeruginosa

Clavulanic acid/Pipracillin وPipracillin)يوضح القيمة التائية بين 17جدول (٤-

عند مستوى الدلالة ٥٪ ، ١٪

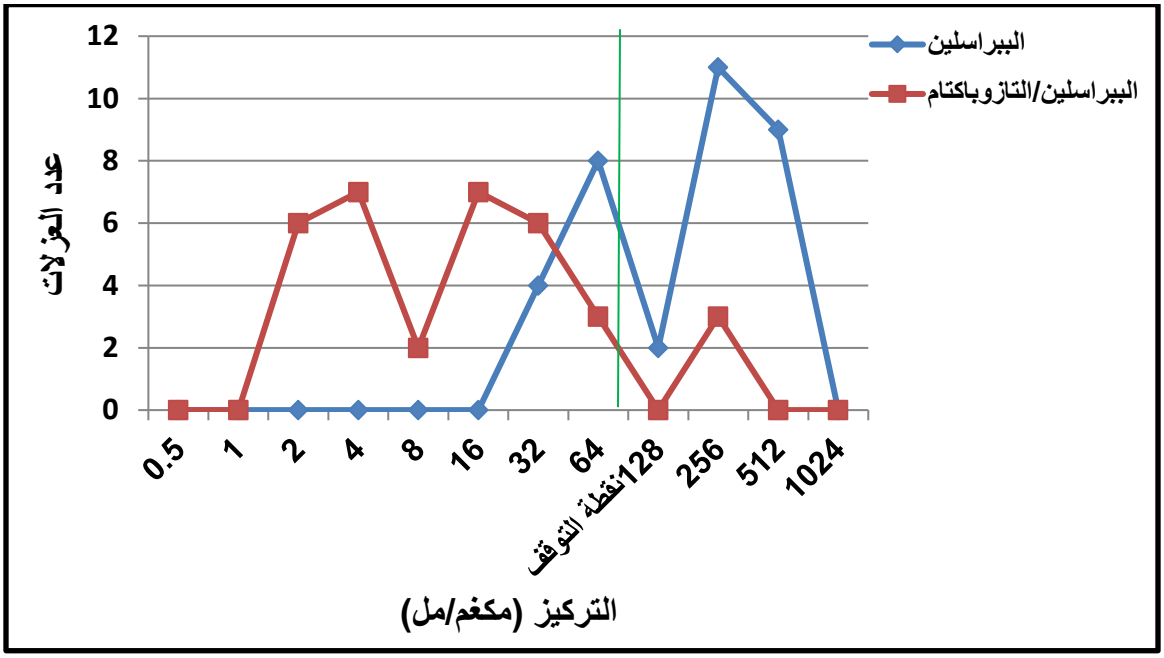
التأثير	حجم العينة N	المتوسط الحسابي Mean	الأنحراف المعياري S.D	درجة الحرية Df	القيمة التائية t		مستوى الدلالة
					المحسوبة	الجدولية	
Pipracillin	34	244.71	183.722	33	7.817**	1.96	٠,٠٥
Pipracillin+Clavulanic acid	34	50.12	87.832			2.576	٠,٠١

** - عالي المعنوية عند مستوى الدلالة ٠,٠١ * - معنوي عند مستوى الدلالة ٠,٠٥

Pipracillin/Tazobactam التازوباكتام / البيراسلين٤٩-٩-٢-

) فإن نسبة العزلات 18) شكل (٤-1 أما توليفة التازوباكتام/بيراسلين وكما موضح بالملحق (١ الحساسة إزدادت من ٣٥,٢٩٪ لمضاد البيراسلين بدون المثبط الى ٩١,١٧٪ بوجود التازوباكتام مما يدل على ان لهذا المثبط القدرة على توسيع فعالية مضاد البيراسلين ضد العزلات البكتيرية

للعزلات M.I.C) ، فقد لوحظ إنخفاض واضح في قيم 18،٤-10المقاومة لهذا المضاد جدول (٤-
وزملاؤه (٢٠٠٥) على بكتريا Mohantyعند مستوى معنوية (١٪،٥٪) ، وفي دراسة أجراها
المعزولة من مصادر سريرية مختلفة في بعض مستشفيات *P.aeruginosa*الزوائف الزنجارية
الهند كانت نسبة العزلات الحساسة لهذة التوليفة في دراستهم ٨١,٣٧٪ ، وعند مقارنة نتائج توليفة
حامض الكلافيولنك مع مضاد الببراسلين بتوليفة هذا المضاد مع التازوباكتام نلاحظ أن الأخيرة هي
الأفضل من حيث أزدياد نسبة العزلات الحساسة وإرجاعها المدى الحساس للمضاد من خلال خفض
وزملاؤه (٢٠٠٨) في دراستهم على بكتريا Pournaras لهذا المضاد ، كما أشار الباحث M.I.C
المعزولة من التهابات المجاري البولية في بعض مستشفيات اليونان أن لتوليفة *P.aeruginosa*
ذات *P.aeruginosa*التازوباكتام / ببراسلين أهمية كبيرة في علاج الأصابات الناتجة عن بكتريا
المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية مقارنة مع التوليفات الأخرى .



) التأثير التآزري لمضاد الببراسلين والتازوباكتام ضد عزلات بكتريا 18شكل (٤-
Pseudomonas aeruginosa

Tazobactam/ Pipracillin وPipracillin)يوضح القيمة التائية بين 18جدول (٤-
عند مستوى الدلالة ٥٪ ، ١٪

التأثير	حجم العينة N	المتوسط الحسابي Mean	الأنحراف المعياري S.D	درجة الحرية df	القيمة التائية t		مستوى الدلالة
					المحسوبة	الجدولية	

Pipracillin	34	244.71	183.722	33	7.654**	1.96	٠,٠٥
Pipracillin+Tazobactam	34	38.82	70.892			2.576	٠,٠١

** - عالي المعنوية عند مستوى الدلالة ٠,٠١ * - معنوي عند مستوى الدلالة ٠,٠٥

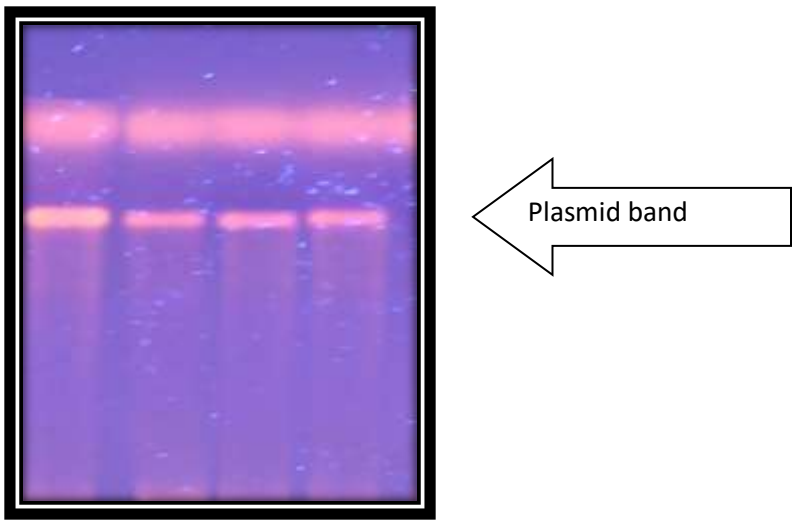
١ النسق البلازميدي لبكتريا الزوائف الزنجارية ٤٥-

Pseudomonas aeruginosa plasmid profil

بأستخدام *P.aeruginosa* تم التحري عن المحتوى البلازميدي لـ(٤) عزلات من بكتريا وتميزت Promega (U.S.A) المجهز من قبل شركة Pure Yield™ Plasmid Miniprep Kit هذه العزلات بأنها مختلفة في مصادر عزلها وفي انتاجها لعوامل الضراوة المختلفة وأنتاجها (لأنزيمات البيتالاكتاميز واكثر العزلات مقاومة للمضادات الحياتية وهذه العزلات هي PU10,PE47 ,PW64, PB71(، وبعد عزل الدنا البلازميدي وترحيل الدنا المستخلص على هلام الأكاروز وجد ان جميع العزلات حاوية على بلازميد مفرد وجميع البلازميدات كانت ذات حجوم متقاربة نسبياً ، كما موضح في الجدول (٤-19) والشكل (٤-19).

يمكن الأستنتاج ان هنالك ارتباطاً من نوع ما مابين نمط المقاومة الواسع لمضادات الحياة وانتاج عوامل الضراوة ، اذ ارتبطت المقاومة المتعددة لمضادات الحياة مع انتاج عوامل الضراوة المهمة في الأستيطان البكتيري Qasim (٢٠٠٦) ، تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل اليه في مدينة بغداد إذ وجد ان جميع عزلاته البالغ *P.aeruginosa* في دراسة اجراها على بكتريا عددها (٦) حاوية على بلازميد مفرد بإستثناء عزلة واحدة كانت غير حاوية على بلازميد وجميع البلازميدات كانت ذات حجوم متقاربة نسبياً.

وقد اشارت الدراسات المتخصصة في هذا المجال الى ان البلازميدات المستخلصة من عزلات التي تحمل صفة تعدد المقاومة لمضادات الحياة تكون كبيرة نسبياً *P.aeruginosa*بكتريا وزملاؤه (١٩٨٢) الى ان احجام البلازميدات Gabisonia) ، كما أشار Senda *et al.*, 1996(التي تحمل صفة تعدد المقاومة لمضادات الحياة تراوحت بين (٢٠-*P.aeruginosa*في بكتريا ١٠٠) ميكا دالتون كما اشارت بعض البحوث الى ان بعض العزلات السريرية لبكتريا *P.aeruginosa*) تمتلك بلازميدات بحجم كبير يصل الى (١٠٦) كيلو قاعدة Vivian *et al.*, 2001.(



الشكل (٤-19) المحتوى البلازميدي لبعض عزلات بكتريا *P.aeruginosa*
العمود (١) : المحتوى البلازميدي للعزلة PU10 العمود (٢) : المحتوى البلازميدي للعزلة PE47
العمود (٣) : المحتوى البلازميدي للعزلة PW64 العمود (٤) : المحتوى البلازميدي للعزلة PB71

يعود في الغالب الى*P.aeruginosa* أشارت دراسات عدة الى أن تعدد المقاومة في بكتريا وقد احتوائها على بلازميدات كبيرة نسبياً ، إذ اشارت دراسة اجريت في الهند على مجموعة من متعددة المقاومة الى ان جميع العزلات كانت حاوية *P.aeruginosa* العزلات الممرضة لبكتريا على بلازميد مفرد ومتشابه ، وعند نقل البلازميد الى بكتريا اخرى كانت حساسة تجاه مضاد الـ Amikacin) اصبحت هذه البكتريا مقاومة لهذا المضاد Shahid & Malik , 2004. (

بأحتوائها على مجموعة من الجينات المحمولة على البلازميدات *P.aeruginosa* تتميز بكتريا لها دور في عملية تكوين المقاومة المستمرة للمضادات الحيوية ويمكن انتقال المقاومة بوساطة Poirel لجعل البكتريا اكثر مقاومة للمضادات الحيوية (Conjugation((الأقتران البكتيري وزملاؤه (٢٠٠١) الى إمكانية إنتقال البلازميدات غير Graupner) ، كما أشار *et al.*, 2001 الأقترانية بوساطة ظاهرة التحول الوراثي في بكتريا *P.aeruginosa* .
لم يكن للبلازميدات الأقترانية وغير الأقترانية الدور الوحيد في نقل بعض المؤشرات الوراثية ، تحوي على عناصر وراثية إضافية كأحتوائها *P.aeruginosa* إذ أظهرت الدراسات ان بكتريا على العناصر القافزة) Transposones) (Dubois *et al.*, 2002. (
على مجموعة من الجينات المتحركة تساهم في تنظيم *P.aeruginosa* كما تحتوي بكتريا إضافة DNA integrase وتعتمد فعالية هذا النظام على أنزيم Recombination آلية عمل نظام الى موقع النظام في هذه البكتريا (Yamane *et al.*, 2004.)

إن تشابه البلازميدات التي أظهرتها النتائج قد يشير الى مدى التقارب بين عزلات بكتريا *P.aeruginosa* وهذا يعطي احتمالية كون هذه العزلات تعود الى السلالة نفسها وبالتالي يعطي مؤشراً جزئياً حول إنتشار هذه البكتريا في بيئة المستشفيات في محافظة ديالى .
وزملاؤه (١٩٨٩) الى إمكانية إستخدام النسق البلازميدي اضافة الى نسق Lipuma أشار المقاومة للمضادات الحيوية في تحديد مدى التقارب بين السلالات البكتيرية وبالتالي معرفة وبائيتها .

المعزولة من أخماج مختلفة*P.aeruginosa*) المحتوى البلازميدي لبكتريا 19جدول (٤-

رقم العزلة	مصدر العزلة	عدد الحزم البلازميدية
PU10	ادرار	١
PE47	التهاب الأذن الوسطى	١
PW64	جروح	١
PB71	حروق	١

١-٤ تحييد البلازميدات Plasmids curing

تم إجراء تجربة تحييد الدنا البلازميدي في محاولة لربط المحتوى البلازميدي لأنتاجية بكتريا *P.aeruginosa* لأنزيمات البيتالاكتاميز ومقاومتها لبعض المضادات الحيوية ، إذ تم استخدام مادة Acridine orange بوصفها مادة محيدة ثم نميت العزلات (PU10 , PE47 , PW64 , PB71) المراد تحييدها في أوساط سائلة تحتوي على هذه المادة بتراكيز (٦٤ , , ٣٢ 16 , ١٢٨ , ٢٥٦ , ٥١٢ , ١٠٢٤ , ٢٠٠٠ , ٢٥٠٠ , ٣٠٠٠) مكغم/مل .

فقدت العزلات الحزم البلازميدية عند التركيز ٥١٢ مكغم/مل شكل (٤-20) ، وأتفقت نتائجنا جزئياً مع ما توصلت اليه المحمداوي (٢٠٠٦) عند إجراء تجربة تحييد الدنا البلازميدي لبكتريا *P.aeruginosa* ، إذ فقدت عزلاتها الحزمة البلازميدية عند التركيز ١٠٢٤ مكغم/مل من مادة Acridine orange ، وبعدها تم إجراء إختبار للعزلات المحيدة من حيث إنتاجها لأنزيمات البيتالاكتاميز ومقاومتها لمضادي الأمبسلين والأموكزاسلين ، وقد أظهرت العزلات (PU10 , PB71) فقدان قابليتها على انتاج أنزيمات البيتالاكتاميز وفقدان مقاومتها لمضادي الأمبسلين والأموكزاسلين ، ويتضح من ذلك ان صفة انتاج أنزيمات البيتالاكتاميز والمقاومة لبعض مضادات الحياة قد تكون محمولة على بلازميد ، اما العزلتان (PE47 , PW64) فلم تفقد مقاومتها لمضادي الأمبسلين والأموكزاسلين مما يشير الى ان صفة مقاومة هذين المضادين في هاتين العزلتين قد تكون محمولة على الكروموسوم .

من الدراسات التي تطرقت الى هذا الموضوع دراسة أجريت في الهند على مجموعة من العزلات الممرضة لبكتريا *P.aeruginosa* وعند إجراء عملية تحييد متعددة المقاومة ، البلازميد اصبحت العزلات أكثر حساسية لمضادات الحياة نفسها الي كانت مقاومة لها قبل نزع البلازميد منها (Shahid&Malik , 2004.)

١ ٢ ٣ ٤



شكل (٤-20) فقدان الحزم البلازميدية لعزلات *P.aeruginosa* المحيدة

Summary

The study was included isolation and identification of (75) isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from (304) samples from patients with different infections in Baaquba Teaching Hospital and Al –Batool Hospital in Baaquba city . The results appeared that the percentage isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from the urin was (41.3%) , otitis media (25.3%) , wound (18.6%) and burn was (14.6%) . All bacterial isolates were identified by the biochemical , cultural and microbial characteristics and confirmed by api-20NE system .

Results of this study indicated that all local isolates were lecithinase producer , while (67) isolates (89.3%) haemolysin producer , (66) isolates (88%) were protease producer , (65) isolates (86.6%) had the

ability to adhere to uro-epithelial cell , (61) isolates (81.3%) were able to agglutinate red blood cells , (37) isolates (49.3%) were urease producer .

The sensitivity of these isolates were tested against (16) antibiotics , the results showed that the Ofloxacin and Ciprofloxacin were found to be the more effective against local isolates with apercentage of resistance 3% , 21% respectively, while the Ampicillin , Amoxacillin , Cephalexin , Co-trimoxazole were non effective with percentage of resistance (100%) .

The results indicated that all the local isolates appeared multi-resistant . Multiple resistance pattern for antibiotic divided into two groups , first group included (23) isolates which were resistant to (6-10) antibiotics , while second group included (52) isolates were resistant to (11-15) antibiotics . Results indicated that the second group was dominant.

The dominated pattern of multiple resistance was eleven antibiotics (Ampicillin – Amoxicillin – Nitrofurantoin – Cephalexin - Co-Trimoxazole - Carbencillin – Cefotaxime – Ceftriaxone – Piperacillin – Ceftazidime -Gentamicin) . The increase in the degree of multiplicity it's accompanied by the addition of specific resistance marker to the pre-existing dominant pattern .

Ampicillin (final concentration 100 µg / ml) was used as a β-Lactam antibiotic group representative for the primary selection of *Pseudomonas aeruginosa* resistant isolates . All isolates showed resistance for final concentration .

Rapid iodometric assay was used to investigated β-Lactamase activity of *Pseudomonas aeruginosa*. It was found that (34) isolates (45.44%) were β-Lactamase producer .

Disk approximation test was used to detect the production of extended spectrum β-Lactamase . Results showed that (7) isolates (20.58%) were positive .

The minimum inhibitory concentration (M.I.C) was determined for eleven antibiotics including Ampicillin , Amoxacillin , Carbencillin , Cephalexin , Cefotaxime , Ceftriaxone , Ceftazidime , Pipracillin , Ciprofloxacin , Gentamicin and Amikacin . Results showed differences ranges among isolates , some were able to resist high concentrations of Ampicillin and Amoxacillin reached 1000 µg / ml , while others were inhibited by 2 µg / ml of Ciprofloxacin .

The values of (M.I.C) for β-Lactam antibiotics (Amoxacillin , Carbencillin , Cephalexin , Cefotaxime , Ceftriaxone , Ceftazidime , Pipracillin) were decreased at the presence of β-Lactamase inhibitors . Results showed that (100%) of *Pseudomonas aeruginosa* isolates were sensitive to Ceftazidime – Clavulanic acid , 0% showed sensitivity to Ampcillin – Sulbactam , while (91.17%) were showed sensitivity to Pipracillin – Tazobactam .

The plasmid content of the four isolates (PU10 (urin) , PE47 (ear) , PW64 (wound) , PB71(burn)) was studed , and the Results showed that all isolates contain single large plasmid band .

Curing was conducted by use of Acridin orange . The plasmids were lost at concentration 512 µg / ml.

The production of β-Lactamase enzyme and the resistance of the four selected isolates to the Ampicillin and Amoxacillin were studied . Results showed that (PU10 , PB71) was unable to produce β-Lactamase enzyme and lose their ability to resist Ampicillin and Amoxacillin,. But isolates (PE47 , PW64) were able to resist Ampicillin and Amoxacillin .

المصادر العربية

- الشويخ ، رنا مجاهد عبدالله . (٢٠٠٦) . إنتاج وتوصيف Protease من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من بعض الحالات السريرية وعلاقته ببعض المضادات الحيوية ، رسالة دكتوراه ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية .

- الصفار ، بتول عبد الأمير باقر . (٢٠١٠) . تأثير مستخلصات قشور البرتقال على نشاط بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المقاومة للمضادات الحيوية والمعزولة من التهابات جروح الحروق وجروح ما بعد العمليات في مدينة بغداد ، رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية .

- الطائي ، هادي رحمن رشيد . (٢٠٠٥) . دراسة بكتريولوجية كيموحيوية وجزيئية لبكتريا *Proteus mirabilis* المعزولة من التهابات المجاري البولية في بعض مستشفيات مدينة بغداد ، رسالة دكتوراه ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية .

- العبيدي ، سوسن شوكت عبد عبد الله . (٢٠٠٢) . تأثير مستخلصات قشور البرتقال على نشاط بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المقاومة للمضادات الحيوية والمعزولة من التهابات جروح الحروق وجروح ما بعد العمليات في مدينة بغداد ، رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية .

- المحمداوي ، خولة جبر خلف (٢٠٠٦) , دراسة كيموحيوية للبروتين A المنتج من العزلة المحلية لبكتريا *pseudomonas* .اطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ،الجامعة المستنصرية.

- المحمدي ، لهيب رجب حماد . (٢٠٠٠) . عزل وتشخيص بكتريا *P.aeruginosa* مع امكانية رسم الخارطة الأفتراضية لحركة هذه البكتريا بين المصادر المختلفة ، رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية .

- المرجاني ، محمد فرج . (٢٠١١) . المضادات الحيوية المقاومة الحيوية البكتيرية للمضادات الحيوية . عمان : دار دجلة .

المصادر الأجنبية

- **Al-Akayleh,** A.T. (1999). Invasive burn wound infection annals of burns and five disasters. J. Surg. Gynecol.Obstet. 12(4) : 1-5.

- **Al-Afifi,** M.S. ; Al-Jarosha, K.H. ; Abu Samaha, S. and El Jadba, N. (2007). Nosocomial infections due to multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. J. Al Azhar.Uni.Gaza,Vol.9, page:1-12 .

- **Abdullah**, R.M. ; Samaan, S.F. and AL-Shwaikh, A.M.(2010). Study the effect of antibiotic combination of beta-lactam and aminoglycoside with

another group of antibiotics and their synergism effect . Journal of Arab Board of Health Specializations , Vol.11 , No 1.

- **Abul- Rasak**, H.H. (2000). Effect of Some β-lactamase inhibitors and Combined Action of Some Antibiotic on *Pseudomnas areuginosa* – resistant to antibiotics and some heavy metals isolated from otities medial: Genetic study. College of Science Almustansiriya. UN.

- **Ahmed**, V.U.; Hussain, J.; Hussain, H.; Jassbi, A.R.; Ullah, F.; Lodhi, M.A.; Yasin, A. and Choudhary, M.I. (2003). First natural urease inhibitor from *Euphorbia decipiens*. Chem. Pharm. Bull. 51(6): 719-23.

- **Akalin,** H.E; (1999). The hole of β-lactam / β -Lactamase inhibitor in the management of mixed infections. J.Antimicrobial. Agents. Chemoth .112 supp 111: 15-20.

- **Al- Gherawi**, R. S. (2009). Effect of *Cinnamomum zeylanicum* Bark and *Apium graveolens* L. Seed on the antibiotic resistant bacteria isolated from UTI female patients (in vitro). M.S.C., thesis. College of science. Al- Mustansiriya University.

- **Ali**, E.N. and Issa. R.H. (2004). Isolation and extraction of flagellar and polysaccharide antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. Al-Mustansiriya J. Sci. 15(1): 87-101.

- **Alipour**, T. ; Sadeghifard, N. ; Amirmozafari, N. ; Ghafurian, S. ; Abdulamir, A.S. ; Mohebi, R. ; Abu Bakar, F. and Raftari, M. (2010). Incidence of Extended Spectrum Beta-lactamase Producing *Pseudomonas aeruginosa* and frecuency of OXA-2 and OXA-10 Genes. Astralian Journal of Basic and Applied Sciences, 4(8):3202-3207.

- **Al-Khaffash** S.S, (1999). Genetic Study of Extended- Spectrum β-Lactamas in *E-coli*. M.S.C., thesis .College of Science. Al-Mustansiriya, UN.

❖ **Al-Saffar**, A.K.H. (2005). Genetic study of *Pseudomonas aeruginosa* cusing burn and wound infections in Babil Governorate . M.S.C., thesis. College of science. Al-Mustansiriya University.

❖ **Al Sahli,** A.A. and Abdulkhair, W.M. (2011). Inhibition of beta-lactamase enzyme of *Pseudomonas aeruginosa* by clavulanic acid of *Rumex vesicarius* L. African Journal of Agricultural Research Vol. 6(12), pp. 2908-2915.

❖ **Al-Tikrity** , A.L. (2009) . Bacteriological and Genetical study of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different human infection.M.Sc.Theses.college of Scince . University of Tikrit.

❖ **Ambler**. R.P. (1980). The Structure of β -Lactamases. Philos. Trans. R.Soc London. Biol. Sci. 289: 321-331.

❖ **Amyes**, S.G.and Gemmell, C.G. (1997). Antibiotic resistance. J. Med. Microboil, 96: 436-470.

❖ **Angelescu**, M. and Apostol, A. (2001). Cefepime (mexipime), large spectrum 4th generation cephalosporin, resistant to beta-lactamases. Chirurgia (Bucur). Nov-Dec. 96(6): 547-52 (Abstract).

❖ **Arora** , K. S.,Ritchings , W.B. ; Al-Mira, C.E. ; Lory , S. and Ramphal. R. (1998). *P.aeruginosa* flageller cap protein FilD, is responsiple for mucin adhesion . J.Infect. Immun. 66(3):1000-1007.

❖ **Atlas**, R. M. ; Parks, L. C. and Brown, A. E. (1995) . Laboratory manual of experimental microbiology. 1st ed. Mosby, Inc, USA.

❖ **Babini**, G.S.; Yuan, M.; Hall, L.M.C. and Livermore, D.M.(2003). Variable susceptibility to pipracillin/tazobactam amongst *Klebsiella spp.* with extended spectrum *β*-lactamases. Journal of Antimicrob.Chemother. 51: 605-12.

❖ **Baho**, S. I. S. (2006). Genetic study on the locally isolated *Pseudomonas aeruginosa* and ability in lectin production. M.S.C. thesis, College of science, Al-Nahrain University.

❖ **Bantar**, C.; Vesco, E.; Heft, C.; Salamone, F.; Krayeski, M.; Gomez, H.; Goassolo, M.A.; Fiorillo, A.; Franco, D.; Arango, C.; Duret, F.and Oliva, M.E. (2004). Replacement of broad-spectrum cephalosporins by piperacillin/tazobactam: Impact on sustained high rates of bacterial resistance. Antimicrob.Agents Chemother. Feb.48 (2): 392-5.

- **Baron**, E. J. and Finegold, S. M. (1990). Baily and Scott`s Diagnostic Microbiology. 8th ed. C.V. Mosby Co. USA.
- **Baron**, E.; Pealler, M.A.; Tenover, F.C.; and Yokken, R.H. (1999). Commensal and Pathogenic Microorganism In Manual Of Clinical Microbiology. (7th) Ed. Vol. (1) 27. ASM Press Washington (USA).
- **Bauer**, S.W.; Kirby, W.M.; Sherris, J.C. and Truck, M.D. (1996) . Antibiotic susceptibility testing by standardized single dose method. American Journal clinical path.
- **Beatson** , A.S.; Whitchurch, B.C.; Sargent, L.J.; Levesque, C.R. and Mattick,O.(2002). Differential regulation of twitching motility and elastase production by *vfr* in *P.aeruginosa* .J.Bacteroil.184(13): 3605-3613.
- **Benett,** P.M. and Chapro, L. (1993). Molecular basis of β – Lactamases induction in bacteria. Antimicrobil. Agents Chemother. 37: 153 – 158.
- **Benson ,** H.G.(2002) . Microbiological Applications (Laboratory Manual in General Microbiology) . Eighth edition published by McGraw – Hill , New York.
- **Bonfiglio**, G.; Perilli, M.; Stefani, S.; Amicosanti, G. and Nicoletti, G. (2002). Performance of extended-spectrum β-lactamases among *Enterobacteriaceae*: an Italian survey. Int.J.Antimicrob. Agents. Mar.19 (3): 213-7.
- **Bradford**, P.A. (2001). Extended-Spectrum β-Lactamases in the 21st century: Characterization, Epidemology, and detection of this important resistance threat. Clin.Microbiol.Rev.14: 933-951.
- **Braun**, P. Bitter, W. and Tommassen, J. (2000). Activation of *Pseudomonas aeruginosa* elastase in *P. putida* by triggering dissociation of the prppeptide – enzyme complex. Microbiol. 146: 2565-2572.
- **Brooks** , G. F.; Butel , J. S.;Carroll, K. C. and Morse, S. A. (2007) . Jawetz , Melinick , J.L. and Adlebergs Medical Microbiology , 24th ed. A lange medical book.
- **Bush**, K.; Jacoby, G.A.; and Medeirose, A.A.(1995). A Functional classification scheme for β -lactamase and its correlation with molecular structure. Antimicrob. Agents. Chemother. 39(6): 1211-1233.
- **Cao**, V.; Lambert, T.; Nhu, D.Q.; Loan, H.K.; Hoang, N.K.; Arlet, G. and Courvalin, P. (2002). Distribution of extended-spectrum β-lactamases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Vitnam. Antimicrobial Agents. Chemother. Dec.46 (12): 3739-43.

- **Cavallo**, J. D., Fabre, R., Leblanc, F., Nicolas-Chanoine, M. H., Tabaut, A. and Gerpb. (2000). Antibiotic susceptibility and mechanisms of β-lactam resistance in 1310 strains of *Pseudomonas aeruginosa*: a French multicentre study (1996). Journal of Antimicrobial Chemotherapy 46, 133–6.
- **Celbrex**, D.; Zocor, R. and Meror, S. (2002). Amikacin in neonatal infection. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 63(4): 106.
- **Chanal.** C., Bonnet, N.; Champs, C.; Sirot, D.; Labia, R. and Sirot, J. (2000). Prevalence of β -lactamase among l, o72 Clinical Strains of *Proteus mirabilis*: a 2-Year survey in French Hospital,. Antimicrob. Agents. Chemother. 44(7): 1930-1935.
- **Choi**, J. Y. ; C. D. Sifri ; B. C. Goumnerow ; L. G. Rahme ; F. M. Ausubal and S. B. Colderwood. (2002). Identification of Virulence Genes in a pathogenic Strain of *Pseudomonas aeruginosa* by representational Difference Analysis. J. Microbiology. 184 : 952 – 961.
- **Christopher**, R.W.; Edwards, I.; and Bonchier, I. (1991). Antibiotic Chemotherapy. P: 193-99 In: Davidson's Principles and Practice of Medicine. (16th) ed. Churchill.
- **Christopher** A. ; Ohi,Mathew and Pollack.S.(2005).Infection due to *Pseudomonas spp*. Of Harrison's, PRINCIPLE OF INTERINAL MEDICINE,16th ed..Mc Graw-Hill,Medical publishing Division.
- **Chuanchune**, R.; Beinlich, K.; Hoang, T.T.; Becher, A.; and Schweizer, R.K.(2001). Multidrug efflux pumps mediate cross-resistance between Triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*: Exposure of a susceptible mutant strain to Triclosan selects nfx mutants over expressing Mex CD-Opr. Journal of Antimicrobial Agents. Chemother.45 (2): 428-32.
- **Collee ,** J. G. ; Fraser , A. G. ; Marmion , B. P. and Simmons , A**.** (1996) . Mackie and McCartney practical medical microbiology . 14th ed. Churchill Livingston . P.173-174 .
- **Cooper**, M.; Tavankar, G. R.and Williams H.D. (2003). "Regulation of expression of the cyanide-insensitive terminal oxidase in *Pseudomonas aeruginosa"*.Microbiology 149(pt5): 1275-84. doi: 10.1099/mic.0.26017-0. PMID 12724389.
- **Cortes**, G.; Borrell, N.; Astorza, B. and Gomez, C. (2002). Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and lipopolysacchride O side chain to the virulence of *klebsiella pneumoniae*

in mnurine mode and of *Pneumoniae*. Infection and Immunity. Vol 70 (5): 2583-2590 .

- **Couturier,** M., Francoise, B., Berguist, P. & Landmass, W.K. (1988). Identitication and classification of bacterial plasmids. Microbial. Rev. 52, 375-395.
- **Cruickshank**, R.; Duguid, J. R.; Marion, B. P. and Swain, R. H. (1975). The practice of medical microbiology. 12thed. vol. 2. Churchil Livingston, U.K.
- **Dalhoff**, A.; Nasu, T. and Okamoto, K. (2003). Beta-lactamase stability of faropenem. Chemotherapy. Sep. 49(5): 229-36.
- **Datta, N** & Hedges, R. W.; Shaw, E.J.; Sykes, R. B. & Richmond, M.H. (1971). Properties of anR-Factor from *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 108(3): 1244-1249.
- **Dattelbaum**; J.D.; Lockatell, C.V.; Johanson, D.E.and Mobley, H.L.T. (2003). Ure R, the transcriptional activator of the *Proteus mirabilis* urease gene cluster, is required for urease activity and virulence in expermintal urinary tract infections. Infect. Immun. Feb. 71(2): 1026-30.
- **Drago**, L.; Vecchi, E.; Mombelli, B.; Valli, M. and Nicola, L. (2001) . Activity of levofloxacin and ciprofloxacin against urinary pathogens. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 48 : 37-45 .
- **Du**, S.J. ; Kuo, H.C. ; Cheng, C.H. ; Fei, A.C.Y. ; Wei, H.W. and Cheng, S.K. (2010). Molecular mechanisms of ceftazidime resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from and human infections. Veterinarni Medicina,55, (4) : 172-182.
- **Dubois**, V. ; Arpin, C. ; Noury, P. and Quentin, C. (2002). Clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* carrying abla $_{TEM-21}$ gene located on a chromosomal interrupted TnA type transposon .J. Antimicrobiol. Chemother. 46(11): 3624-3626.
- **Engel**, L. S., J. M. Hill, A. R. Caballero, L. C. Green, and R. J. O'Callaghan. (1998). Protease IV, a unique extracellular protease and virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol. Chem. 273:16792–16797.
- **Farrell,** D.J., Morrissey, I., De Rubeis, D.; Robbins, M& Felmingham, D. (2003). AUK Multicenter study of the antimicrobial suscptibility of bacterial pathogens causing urinary tract infection. J. Infect. (46): 94-100.

- **Feltzer**, R E.; Gray, R. D.; Dean, W. L. and Pierce, W. M. (2003). Alkaline proteinase inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa* a interaction of native and N-terminally truncated inhibitor proteins with *Pseudomonas* alkaline proteinase. J. Biol. Chem., 278(28): 25952-25957.
- **Finch,** R. (1984). Antibacterial Chemotherapy. Medicine International. (2nd) Series. 2:41-49.
- **Fiorillo**,L.,Zucker,M. and Sawyer,D.(2001)The *Pseudomonas* hot-foot syndrome.N Engl .J.Med. ,2;345(5):335-8.
- **Fisher**, J. (1984). β-lactam resistant to hydrolysis by the *β*-lactamases. In antimicrobial drug resistance (Bryan, L.E.Ed.), pp.33-79. Academic Press Orlando.
- **Flamm** R.K.; Weaver R. K.and Thornsberry, C.(2004). Factors associated with relative rates of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates tested in clinical laboratories in the United States from 1999 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother*. 48:2431-2436.
- **Fluit**, A.C.; Visser, M.R.&Schmitz, F.J.(2001).Molecular detection of antimicrobial resistance. Clinical Microbiology Reviews. Oct. 836-71.
- **Forbes**, B. A. ;Sahm, D. F. and Wessifeld, A. S. (2002) . Bailey and Scotts' diagnostic microbiology . 9th ed . Mosby . U.S.A. Vol.1:509 .
- **Francioll**, M. (1991). β -Lactamas inhibitor cominations for oral administrations. Schmeiz-Med- Wochenschr. 121(39): 1399-1407.
- **Frank**, U.; Mutter, J.; Schmidt-Eisenlohr and Daschner, F.D. (2003). Comparative in vitro activity of piperacillin, piperacillin-sulbactam and piperacillin-tazobactam against nosocomial pathogens isolated from intensive care patients. Clin. Microbiol. Infect. 9: 1128-32.
- **Frifelder.** D. (1987). Molecular Biology- (2nd) ed. Yones and Barttorr. Boston.
- **FunG-Tomc**, J.C.; Gradelski, Eivalera, L.; Kalek, B.; and Bonner, D.P.(2000). Comparative Killing Rates Of Fluroquinolones and Cell Wall Active Against. J.Antimicrob.Agents Chemother. 44: 1377-80.
- **Gabisonia**, T. G. ; Gallushka, F.P. and T. G. Chanishvili. (1982). Conjucative R Plasmids Isolated from Hospital of *Pseudomonas aeruginosa.* Antibioti. Khilioter. 37 (12) : 39 – 41.

- **Gaynes**, R.; Edward, J. R.; and National Nosocomial Infections Survulance system.(2005). overview of nosocomial infections caused by Gram negative bacilli, Clin. Infect. Dis. 41: 848-854.

- **Goering**, R.V.; Dockrell, H.M.; Wakelin, D.; Zuckerman, M.; Chiodini, P.L.; Roitt, I.M. and Mims, C. (2008). *Mims medical microbiology*. 4th ed. Mosby. China.
- **Graupner**, S. ; Weger, N. ; Sohni, M. and Wackernagel, W. (2001). Recquirment of novel competence genes *pil* T and *pil* U of *P.stutzeri* for natural transformation and suppression of pil T deficiency by a hexahistidine tag on the type IV pilus protein *pil* Al.J. Bacteriol. 183(16):pp.4694-4701.

- **Greenwood**, D.; Slack, R. and Peutherer, J. (1997). Medical Microbiology 15thed. Churchill Livingstone inc.

- **Guan**, L. and T. Nakae (2001). Identification OF Esential Charged Residues in Transmembrane Segments of Multidrug Transporter mexB of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriology. 183 : 1734 – 1739.

- **Hagberg**, L.; Jodel. U. & Lindberg, U. (1981). Adhesion, Haemagglutination and Virulence of *E.coli* causing U.T.Is. Infec. Immun, 31:564-570.

- **Hall**, S. ; Shrestha, R and Vogel, S. (2004). Methicillin\Oxacillin-Resistant *Staph aureus* (MRSA\ORSA) : Laboratories Detection . 15:2-10.
- **Hanna**, S. L. ; N. EW. Sherman ; M. T. Kinter and J. B. Goldberg (2000). Comparison of proteins expressed by *Pseudomonas aeruginosa* strains representing Initial and chronic Isolates from a cystic fibrosis patient : an analysis by 2-D gel electrophoresis and capillary column Liquid chromatography tandem mass spectrometry. Journal of Microbiology. 146 : 2495 – 2508.

- **Harley**, J. P. and Prescott, L. M. (1996). Laboratory exercises in Microbiology. 3rd ed. McGraw Hill. USA.

- **Hasegawa**, M. ; Kobayashi, I. ; Saika, T. and Nishida, M. (1996). Drug – Resistance Patterns of Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Regard to Their Lipopolysaccharides-Chain Sizes. Kansenshogaku-Zasshi. 70 (6) : 606 – 612.

- **Hauser**, R.A. and Sriram, P. (2005). Severe *Pseudomonas aeruginosa* infection . J. Infect. Postgraduate Medicine.117(1):1-10.

- **Hebeisen**, P.; Heinze-Krauss, I.; Angehrn, P.; Page, M.P.G.and Then, R.L. (2001). In vitro and in vivo properties of Ro 63-9141, a novel broad-spectrum cephalosporin with activity against methicillin-resistant *Staphylococci.* Antimicrobial Agents. Chemother. Mar. 45(3): 825-36.

- **Holt**,J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.A.; and Williams, S.T.(1994). Bergy' s Manual Of Derminative Bacteriology. (9th) ed.
- **Hussar**, A. D. (2001). New drugs of 2000. Am. Pharmaceutical Association, Inc. 41(2): 229-272.

- **I wahi**, T.; Abs, R.; Nako, M. and Imado, A (1983). Role of type-1 fimbriae in the pathogensis of ascending U,T.I by *E.coli* in mice Infec. Immune. 39:1307-1315.

- **Jacoby**, G.A. & Sutton, L. (1985). β -Lactamases and β-Lactam resistance in *E . coli* Antimicrob. Agents. Chemother, 28(5): 703-705.

- **Jacoby,** G. A. & Mederios, A. (1991). More Extended – spectrum β– Lactamases. Antimicrob. Agents. Chemother. 35 (9): 1697 –1704.

- **Jacoby**,G.A.(1994).Genetices Of Extended- Spectrum Beta-Lactamases. Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.Supplement. 1: 2-11.

- **Japoni**, A.; Alborzi, A.; Kalani, M.; Nasiri, J.; Hayati, M. and Farshad, S. (2006). Susceptibility patterns and cross-resistance of antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in the South of Iran. Burns. 32(3):343-347.

- **Jarlier**, V.; Nicolas, M.; Fournier, G.; and Philippon, A. (1988). Extended broad-spectrum β-Lactamases conferring transferable resistance to newer β-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: Hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev. Infect. Dis. 10(4): 867-78.

- **Jia**, C. G. (1992). Plasmid Fingerprinting Technique Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from a Burn Unit. Chung Hua Cheng Hsing Shao Shang Wai Ko Tsa Chin. 8 (2) : 139 – 140.

- **Joklik,** W.K.; Wikett, H.P.; Amos, D.B.; and Wifert, C.M. (1992). Zinsser Microbiology. (20th) ed. Appeston & Longe. U.S.A.

- **Johston**, J.N. and Richmond, M.H. (1970). The increased rate of loss of penicillin' s plasmids from Staphylococcus aureus in the present of rifampcin. J. gen. Microbiol. 60 : 137-139.

- **Jones**, R.N. and Varnam, D.J. (2002). Antimicrobial activity of broad-spectrum agents tested against Gram-negative bacilli resistant to ceftazidiome. Diagan-Microbial-Infect-Dis. 44(4) :82 – 379 .
- **Jones**, R. N. and Pfaller, M. A. (2002). Ciprofloxacin as broad – spectrum empiric therapy – are fluroquinolones still viable monotherapeutic agents compared with beta-lactams : data from the Mystic program (US) Diagn. Microbial infect. 42 : 213 – 215.
- **Kaitwatcharachi**, C.; Vasuvattakul, S.; Yenchitsomeans, P. (1999). Distal Renal Tubular Acidocis & High Urine Carbon Dioxide Tension In Patients With South East Asian Ovolocytosis. Am.J.of Kidney. Dis. 33: 1147-51.
- **Kalkarni**, R.S. and Kanekar (1998). Effects of some curing agents on phenotyping stsbility in *Pseudomonas putida* degrading epsilon – caprolocam. J. Microbiology and Biotechnology . 14(2) : 255-257.
- **Karlowsky**, J.A.; Jones, M.E.; Thornsberry, C.; Friedland, I.R.and Sahm, D.F. (2003). Trends in antimicrobial susceptibilities among *Enterobacteriaceae* isolated from hospitalized patients in United States from 1998 to 2001. Antimicrobial. Agents . Chemother. May; 47(5): 1672-80.
- **Katzung**, B.G. (2001). Basic and Clinical Pharmacology. (8^{th}) ed. Lange Medical Books. McGraw-Hill. New York.
- **Kaye,** K.; Fraimow,H. and Abrutyn,E.(2000).Pathogens resistant to antimicrobial agent .Epidemiology ,molecular mechanisms, and clinical management .Infect.Dis.Clin.North Am.,14(2):319-293.
- **Kazmierzak,** A.; Cordin, X.; Duez, J.M.; and Sirot, J. (1990). Differences Between Clavulanic acid and Sulbactam in Induction and Inhibition Of Cephalosporines In Enterobacteriaceae. J.Inter.Med.Res.18: 76D-7D.
- **Kennth Todar's**.(2004)Textbook of Bacteriology on line,Wisconsin-Madison Dept.of Bacteriology.
- **Koch,** A.L., (2000) Penicillin binding proteins β - Lactamase, and Lactamases: offensive, Attacks and Detersive counter measures, Microbiol, 26(4): 205-220.
- **Kohler**, T. , Curty.L.K.; Barja,F. ; Delden, V.C. and Pechere, C.J.(2000). Swarming of *P.aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili . J. Bacteriol. 182: 5990-5996.
- **Koneman**, E.W; Allen, S.D; Janda, W.M; Schreckenberger, P.C and Winn, W.C.J.(1992). Color Atlas and Textbook Of Diagnostic Microbiology. (4^{th}) ed. J.B.Lippincott Company. Philadelphia.

- **Landman** D, Quale JM, Mayorga D, *et al*. (2002).Citywide clonal outbreak of multiresistant Acinetobacter baumannii and *Pseudomonas aeruginosa* in Brooklyn, NY: the preantibiotic era has returned. *Arch Intern Med*. 162:1515-1520.
- **Larsson**, P. (1978). Acomparison of the host Parasite relationship in U.T.I. caused by *Proteus* and *E.coli* in Animal and children. Goeteborg.P. 12.
- **Laura,** P.; Roberta, M.; Lucia; P.; Ceilia, M.; Ernesto G; Gianfranco, A.; Egidio, R. and Gian, M. (2002). Emerging extended spectrum β-Lactamases in *Proteus mirabilis.*
- **Laurence**, D.R.; Bennett, P.N.; and Brown, M.J. (1997). Clinical Pharmacology. (8th)ed .Churchill Livingstone London.
- **Lee**, S. ; Park, Y.J. ; Kim, M. ; Lee, H.K. ; Han, K. ; Kang, C.S. and Kang, M.W. (2005). Prevalence of Ambler class A and D β-lactamases among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Koria. Antimicrob Chemother 56, 122-127.
- **Lei**, Y. ; Sato, K. and Nakae, T. (1991). Ofloxacin – resistant *Pseudomonas aeruginosa* Mutants with Elevated Drug Communications. 178 (3) : 1043 – 1048.
- **Levinson**, W. and Jawets, E. (2000). Medical Microbiology and Immunology examination and board review.(6th) ed.
- **Levy**, S. (2001). The challenge of antibiotic resistance. Sci.Am. 278: 32-39.
- **Li,** X.; Lockatel, C.V.; Johnson, D.E.; Lane, M.C.; Warren, J.W.and Mobley, H.L.T.(2004). Development of intranasal vaccine to prevent urinary tract infection by *Proteus mirabilis.* Infect. Immun. Jan. 72(1): 66-75.
- **Liaw**, S.J. ; AI, H.C. ; HO, S.W. ; Luh, K.T. and Wang, W.B. (2000). Inhibition of virulence factor expression and swarming differentiation in *Proteus mirabilis* by *p*-nitrophenly glycerol. J. Med. Microbiol. 49: 725-731.
- **Lindgren**, V. ; R. M. Gardner and C. C. Sanders. (1999). Genetic mapping of the structural gene for phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. J. Bacteriol. 172 (2) : 1155 – 1156.

- **Lipuma**, J.J.; Stull, T.L.; Dasen, S.E.; Pidock, K.A. and Kazeniomiski, O.M. (1989). DAN Polymorphism among *E. coli* isolated from bacteriuria Women. J. Infect. Dis. 159: 526-531.
- **Livermore**, D.M. (1995). β-lactamases In Laboratory and Clinical Resistance. Clin.Microbiol.Review 8(4): 560.
- **Livermore** DM. (2000). Epidemiology of antibiotic resistance. Intensive Care Med, 26:S14–S21.
- **Livermore**, D. M. (2002). Multiple mechanisims of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* : Our worst night ware ?. Clin. Infec. Dis. 34: 634-640.
- **Lynch D.**(2004). Cranberry for prevention urinary tract infection. Am.Fam Physicians. 70:2175-77.
- **Lynch** JP. (2001). Hospital – acquired pneumonia risk factors. Microbiology and treatment . Chest; 119:373S-84S.
- **Lyobe,** S. Tsunoda, M. and Mitsuhashi, S. (1994). Cloning and expression in Enterobactericeae of the extended spectrum β-lactamase gene from *P.aeruginosa* plasmid . Microbiol. 121: 175-180.
- **MacFaddin**, J. F. (2000). Biochemical test for identification of medical bacteria. 3rd ed. The Williams and Wilkins. Baltimore, USA.
- **Mandell**, G.L.; Bennet, J.E.; and Dolin, R.(1995). Principles & Practice Of Infectious Diseases. (4th) ed. Churchill Livingstone, London.
- **Mahon**, R. and Manuselis, G. (2000). Diagnostic Microbilogy 2nd ed. Saunders company U.S.A.
- **Maniatis**, T.; Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning: Alaboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring, New York.
- **Marchandin**, H.; Jean-Pierre, H.; De Champs, C.; Sirot, D.; Darbas, H.; Perigault, P. F. and Carriere, C. (2000). Production of a TEM- 24 plasmid-mediated extended-spectrum β- Lactamase by a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa* . Antimicrob. Agents Chemoth. vol. 44(1): 213-216.
- **Masuda**, N, E. Sakagawa, S. Ohya, N. Gotoh, and Nishino, T. (2001). Hypersusceptibility of the *Pseudomonas aeruginosa* nfxB mutant to _-lactams due to reduced expression of the AmpC - lactamase. Antimicrob. Agents Chemother. 45:1284–1286.

- **Matsumoto,** y.& Inoue. M. (1999). Charactrization of SFO-l- a plasmid- mediated inducible classA β - lactamase from Enterobacter cloacae. J. Antimicrob. Agents. Chemoth. 93(2) 307-313.

- **Marty**, N. ; Pasquier, J.L. ; Dournes, K.C. ; Chavagnat, F. ; Guin, M. ; Chabanon, G, ; Pipy, B. and montrozier, H. (1998). Effects of characterized *Pseudomonas aeruginosa* exopolysaccharidse on adherence to human tracheal cells. J.Med.Microbiol. 47: 129-134.

- **Merino**, S.; Rubires, X.; Aguilar, A. and Tomas, M.J. (1997). The role of O1-antigen in the adhesion to uroepithelial cells of *Klebsiella pneumoniae* grown in urine, Microbial Pathogenesis, vol.23 (1) : 49-53.

- **Miller**, L.A.; Ratnam, K. and Payane, D.J.(2001). β-lactamase – inhibitor combinations in the 21st century: current agents and new developments. *Curr Opin Pharmacol*, 1 : 451-8.

- **Mohanty**, S.; Singhal, R.; Sood, S.; Dhawan, B.; Das, B.K. and Kapil, A. (2005). Comparative in vitro activity of beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations against Gram negative bacteria. Indian J MED Res 122. pp: 425-428.

- **Morshed**, S. R. M. ; Y. Lei ; H. Yoneyma and T. Nakae. (1995). Expression of Genes Associated with Antibiotic Extrusion in *Pseudomonas aeroginosa*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 210 (2) : 356 – 362.

- **Muhsin,** E.A. (2010). Astudy of some immunological aspects in children with renal disease. M.S.C., thesis. College of science. Al- Mustansiriya University.

- **Mulrooney**, S.B.; and Hausinger, R.P. (2003). Nickel uptake and utilization by microorganisms. FEMS Microbiology Reviews. 27: 239-61.
- **Murray**, P.R.; Baron, E.J.; Pfaller, M.A.; Tenover, F.C. & Yolken, R.H. (1999). Manual Of Clinical Microbiology. (7th)ed. American Society Of Microbiology. Washington, U.S.A.

- **Naas,** T.; Zerbih, M.; Girlich, D.; Nordmann, P. (2003). Integration of Transposon Tn1- Encoded inhibitor resistant β -Lactamase Gene *bla*TEM-67 from *Proteus mirabilis,*, into *the Escherichia coli* chromosome. J. Antimicrob. Chemoth. 47 (1): 19-20.

- **National Committee For Clinical Laboratory Standareds** (2002). Perfomance Standared For Antibiotic Susceptibility Testing NCCLS. Villanova P.A.

- **Neu**, H.C. (1985). Contribution Of Beta-lactamases To Bacterial Resistance and Mechanisms to Inhibit Beta-lactamases. The American Journal of Medicine. 79 (Suppl.) 1-11.
- **Neu**, H.C. (1994). The 10 Most Commonly Asked Questions About Cephalosporines. Infect.Dis.In Clinical Practice. 3: 209.
- **Neuwirth,** C.; Siebor, E.; Pechinot, A.; Duez, J-M.; Pruneaux, M.; Garel, F.; Kazmierczak, A.and Labia, R.(2001). Evidence of in vivo transfer of a plasmid encoding the extended-spectrum β-lactamase TEM-24 and other resistance factors among different members of the family *Enterobacteriaceae.* Journal of Clinical Microbiology. May.39 (5): 1985-8.
- **Nikaido**, H., and T. Nakae. 1979. The outer membrane of gram-negative bacteria. Adv. Microb. Physiol. 20:163–250.
- **Nikaido**, H.(1985). Molecular basis of bacteria outer membrane permeability. Microbiological Review. 49: 1-32.
- **Nikaido**, H. (1998). Multiple antibiotic resistance and efflux. Curr. Opin. Microbiol. 1 : 516 – 523.
- **Norman**, S.R.; Suau, F.R. and Morris, P.J. (2002).Variability in *P.aeruginosa* lipopolysaccharide expression during crude oil degradation. Microbiol. J. 68(10) : 5096-5103.
- **O'Connell,M.(1984)**. Genetic Transfer in prokaryotes transformation, transduction and conjugation.: 2 — 13 in Advanced Molecular Genetic by publisher, A. and Timmis. K. Springer verlug — Berlin.
- **Oguntibeju**, O.O. and Nwobu, R.A.U.(2004). Occurrence of *P.aeruginosa* in post –operative wound infection .J.Med,Sci. 20(30): 187-191.
- **Oizumi**, K.; Ohno, T.; Kawahera, M.; Kawaguchi, S; Saiho, M.; Mitutake, Y.; and Takcbe, K.(1995). A comparative study of tazobactam/piperacillin and piperacillin in bacterial pnenomena. Jpn.J.Antibiot. 48(4): 449-81.
- **Olayinka** A.T.; Onile B.A. and Olayinka BO.(2004). Prevalence of multi-drug resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* isolates in surgical units of Ahmadu Bello University Teaching Hospital, Zaria, Nigeria: an indication for effective controle measures. Ann Afr Med;3(1):3-16 .
- **Oliver,** A.; Vazquez, M.B.and Ferrer, M.M.(1999). Ampicillin-Sulbactam and Amoxicillin-Clavulanate Susceptibility Testing Of *E coli* Isolates With Different β-lactam Resistance Phenotypes. J. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 862-7.

- **Ostroff**, R. H. and M. L. Vasil. (1987). Identification of a new Phospholipase C activity by analysis of an insertional mutation in the hemolytic phospholipase C structural gene of *Pseudomonas aeruginosa* J. Bacteriol. 169 (10) : 899 – 908.
- **Orretti**, A.F. (2004). Antimicrobial susceptibility survey of *P.aeruginosa* strain isolated from clinical sources J. Microbiol. 96 (8) : 1065-1069.
- **Pai,** H.; Kim, J.W.; Kim, J.; Lee, H.; Choe, K.W.; & Goton, N.(2001). Carbapenem Resistance Mechanisms In *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isoletes. Antimicrob. Agents. Chemother. 45 (2): 480-4.
- **Paul**, S. ; R. L. Bezbaruh ; M. K. Roy and A. C. Ghosh (1997). Multiple Antibiotic Resistance (MAR) Index and its Reversion in *Pseudomonas aeruginosa* Letters in Applied Microbiology. 24 (3) : 169 – 171.
- **Pellegrino**, F.L.P. ; Santos, K.R.N. ; Riley, L.W. and Moreira, B.M. (2006). bla $_{GES}$ carrying *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a public hospital in Rio de Janeiro , Barazil. Barazilian Journal of Infectious Diseases , 10(4) : 251-253.
- **Peterman**,R.S.; Doetkott, C. and Rust, L.(2001). Elastase deficiency phenotype of *P.aeruginosa* canine otitis externa isolates. J. Clin Diagn Lab Immun. 8(3): 632-636.
- **Philippon**, A.; Arlet, Gand Jacoby, A.G. (2002). Plasmid-determined AmpC-Type β-Lactamases. Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy vol,46 (1) : 1-11.
- **Pitt**, T. L. ; M. Sparrow ; M. Warner and M. Stefanidou (2003). Syrvey of Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* from UK patients with Cystic fibrosis to six commonly prescribed antimicrobial agents. Thorax. 58 : 794 - 796 .
- **Plaucha**, A.; Mikiewicz, B and Hryniewicz, W. (1999). Concurrent out breaks of extended-spectrum β-Lactamase-producing organisms of the family Enterobacteriaceae in a Warsaw Hospital. Journal of Antimicobial Chemotherapy 44 : 489-499.
- **Poirel,** L.N.; Guibert, T.; Labia. E.B.; Nordmann, P. (1999). Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended- Spectrum β-Lactamas, encoded by an *Escherichia coli* integron gene. Antimicrob. Agents. Chemotherapy. 43:573-581.
- **Poirel**, L. ; Nass, T. ; Nicolas, D. ; Collet, L. ; Bellais, s. ; Cavallo, J. and Nordman, P. (2000). Characterization of VIM-2, acarbapenem hydrolyzing metallo-β-lactamase

and plasmid and integron-bornegene from a *Pseudomonas aeroginosa* clinical isolates in france . J. Antimicrob.Agent. Chemother.44(4): 891-897.

- **Poirel**, L. ; Rotimi, V.O. ; Mokaddas, E.M. ; Karim, A. and Nordman, P. (2001). VEP-1-Like extended – spectrum β-lactamases in *Pseudomonas aeroginosa* ,Kuwait. Emerging Infectious Diseases. Vol.7,No.3.

- **Poole**, K. ; K. Gotoh ; H. Tsujimoto ; Q. Zhao ; A. Wada and T. Yamasaki. (1996). Overexpression of the *mexC-mexD-oprJ* efflux operion in *nfxB*-type multidrug resistant strains of *Pseudomonas aeroginosa* . Mol. Microbiol. 21 : 713 – 724.

- **Poole**, K. (2002). Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistence . J. Appl. Microbiol. 92, Suppl.1:55S-64S.

- **Pope**, A.J.; Toseland, C.D.N.; Rushant, B.; Richardson, S.; McVey. M.; & Hills, J.(1998). Effect of potent urease inhibitor flurofamide, on *Helicobacter spp.* In vivo and in vitro. Digestive Diseases & Sciences. Jan.43 (1): 109-19.

- **Pournaras**, S. ; Ikonomidis, A. ; Neou, E. ; Kantzanou, M. ; Maniatis,A.N. and Tsakris, A.(2008). Piperacillin/ tazobactam- hetero resistant *Pseudomonas aeroginosa* from urinary infections,successfully treated by piperacillin/ tazobactam. Journal of Antimicrobial Chemotherapy . doi:10.1093/jac/dkm528.

- **Prescott**, L. M.; Harley, J. P. and Klein, D. A. (2005). Microbiology. 6th ed. McGraw. Hill companies Inc. New York.

- **Puzova**, H. ; L. Siegfried ; H. Kmetova ; J. Durovicova and A. Kerestesova (1994). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Urinary tract Infections. Folia microbiologia. 39 (4) : 337 – 341.

- **Qasim**, K.W. (2006). Effect of some chemical and physical factors on *Pseudomonas aeroginosa* membrane permeability. M.S.C. thesis . College of Sciences . Baghdad University.

- **Rabaey**, K. and Verstracte, W. (2005). Microbial Fuel Cells: novel biotechnology for energy generation. Trends in Biotechnology. 23(6): 291-298.

- **Raka**, L.; Mulliqi,-Osmani, G.; Berisha, L.; Begolli, L.; Omeragiq, S.; Parsons, L.; Salfinger, M.; Jaka, A.; Kurti, A and Jakupi, X.(2004). Etiology and susceptibility of urinary tract isolates in Kosova. Int.J.Antimicrob.Agents. Mar.23 (Suppl 1): 2-5.

- **Rashid**, A. ; Chowdhury, A. ;Rahman, S.H. ; Begum, S.A. and Muazzam, N. (2007). Infections by *Pseudomonas aeroginosa* and Antibiotic Resistance Pattern of the Isolates from Dhaka Medical College Hospital. Bangladesh.J. Med. Microbiol.01 (02): 48-51.
- **Reading**, C& Cole, M. (1977). Clavulanic acid β -lactamase inhibting β -lactam from streptomysen clauligers. Antimicrob Agent. Chemother. 11(5): 852-857.
- **Recchia,** G.D.& Hall, R.M.(1995). Gene cassettes a new class of mobile elements. Microbiology. 141,3015.2027.
- **Reuter**, H.D. and Sendel, A. (1994). *Allium sativum* and *Allium ursinus* :chemistry , pharmacology and medicinal application-London Academic Press. 6: 55-113.
- **Rezaee**, M. A.; Nejad, Q. B.; Pirayeh, Sh. N. and Owlia, O. (2002). Higher aminoglycoside resistance in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* than in Non- mucoid strains. P. Owlia phD. Department of microbiology, faculty of medicine, Shahed University, No. 29, keshavarz bivd., Tahran, Iran. Fax:+98-21-8966310.
- **Rice,** L.B., Willeg, S.H. Papanicolaou, G.A. Mederriors A& Jacoby, G.A.(1990). Outbreake of Ceftazidium resistance caused by extended Spectrum β - Lactamases at Mussach usetts Chronic- Care Racility. Antimicrob. Agents. Chemother.34: 2193-2199.
- **Ripa** , s.; Ferrante , L . and Preena, M. (1990). Pharmacokinethcs of sulbactam / ampicillin in humans after intravenous and intramuclar injection. Chmother. 36: 185 –192.
- **Rokos**, A. ; Samicka-Grzelak, A.; Kot, K.; Pituch, H.; Meisel-Mikolajczyk. F. and Luczak, M. (2000). Beta – Lactamases with a wide. Substrate spectrum in gram-negative Strictly anaerobic rods Mod. Dosw. Mikrobid.52: 129-137.
- **Rolinson**, G.N.(1991). Evdution of β -Lactamase inhibitors. Sury. Gynecol. Obstct. 172 suppl: 11-16.
- **Rotschafer**, C. and Peterson, M. (2004). Aminoglycoside tutorial. University of Minnesota. (from Internet).
- **Ruiz**, J. (2003). Mechanisins of resistance to quinolones target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. Journal of Antimicrobial Chemotherapy; 51 : 1109-1117.
- **Ryan,** K. J. and Ray, C. G. (2004). Sherris Medical Microbiology. 4th ed. McGraw Hill, ISBN 0.8385-85: 9-9.

- **Sambrook**, J. ; E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- **Sanders,** W. E.. & Sanders, W.E. (1992). β -Lactam resistance in gram- Negative bacteria: Globel trends and clinical impact. Clin. Infect 15:828-839.
- **Sanders,** C.C.; Thomoson, K.S. and Bradford. D.A. (1993)- Problems with the detection of β. lactam resistance among non-fastidious gram- negative bacilli. Infect. Dis. Clin. North. AM. 7(2): 411-424.
- **Sanders** M.E**..**Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health.J. Mutr.(2000);130:384S-390S.
- **Senda**, K. ; Y. Akakawa ; K. Nakashima ; H. Ito ; S. Ichiyama ; K. Shimakata ; N. kato and M. Ohta. (1996). Multifocal Outbreaks of Methalo-β- lactamase – Producing *Pseudomonas aeruginosa* Resistance to Broad – Spectrum β- lactamase , including Carbapenems. Antimicrobial Sgents and Chemotherapy. 40 : 349 – 353.
- **Shahid,** M. and Malik, A. (2004). Plasmid Mediated Amikacin Resistance in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Medical. 22 : 182 – 184.
- **Sherlock**, O.; Schembri, A.M; Reisner, A. and klemm , P. (2004). Novel roles for the AIDA adhesion from diarrheagenic *E.coli*, cell aggreagation and biofilm formation. Journal of Bacteriogy; vol 186 (23) : 8058- 8065 .
- **Songer** , G. (2004). Virulence factors and pathgensis of Pseudomonas aeruginosa . The University of Arizona.
- **Spanu,** T.; Luzzaro, F.; Perilli, M.; Amicosanti, G.; Toniolo, A.; Fadda, G.; and The Italian ESBL Study Group (2002). Occurance of extended-spectrum *β*-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* in Italy: implications for resistance to β-lactams and other antimicrobial drugs. Antimicrobial Agents . Chemotherapy. Jan.46 (1): 196-202.
- **Still**, J.M. and Law, E.J. (2001). Primary excision of the burn wound. Clin Plast Surg. (1): 23-47. (Medline).
- **Stocks**, E.J. and Ridgway, G. (1987). Handling clinical speciment for microbiology studies; 5th ed. Churchill living stone Edinburgh . p: 173-201.

- **Strateva**, T. ; Ouzounova-Raykova, V. ; Markova, B. ; Todorova, A. ; Martiva-Proevska, Y. and Mitov,I. (2007). Problematic clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from the university hospitals in Sofia, Bulgaria: current status of antimicrobial resistance and prevailing resistance mechanisms. J.Med.Microbiol.56:956-963.
- **Sweet,** R .L. ; Roy,,S . ; Faro, S.; Brien, WF. ; Sanfillipo .JS. Seidlin, M. (1994). Pipracillin and Tazobactam Versus clindamycin and gentamicin in the treatment of hospitalized women with pelvic infection the Pipracillin / tazobactam study group . abstract-gynecol. 83 (2) : 280 – 285 .
- **Sykes**, R.B.and Mathew, M.(1976). The β-Lactamases of Gram negative bacteria and their role in resistance to β-Lactam antibiotic. J, Antimicrobial Chemotherapy; 2 : 115-157.
- **Takeda**, S.; Nakai, T.; Wakai, Y.; Ikeda, F. and Hatano, K. (2007). In vitro and in vivo activities of a new cephalosporin, FR264205, against *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 51(3): 826-830.
- **Tam**, V.H.; Mckinnon, P.S.; Akins, R.L. and Rybak, M. (2002). Pharmacodynamic of cefepim in patients with Gram-negative infections. Journal-Antimicrob-Chemother; 50(3) : 8-425.
- **Tanak**, T.; Kawase, M.; Tani, S.(2003). Urease inhibitory activity of simple α, β-unsaturated ketones. Life Sciences. 73: 2985-90.
- **Thureen,** P.J.; Reither, P.D.; Gresores, A. (1999). Once - Versus Twice Daily Gentamicin Dosing In Neonates 34 Weeks Gestation: cost -ffectiveness Analysis. Pediatrics. 103: 594-8.
- **Tierney,** L.M.Jr.; McPhee, S.J.; Papadakis, M.A. (1999). Current Medical Diagnosis & Treatment. (38th) ed.Appleton & Lange U.S.A.
- **Todar**.(2004)Textbook of Bacteriology on line,Wisconsin-Madison Dept.of Bacteriology.
- **Todar**, K. (2008). *Pseudomonas aeruginosa.* Todar's Online Textbook of Bacteriology. University of Wisconsin- Madison Department of Bacteriology.
- **Tortora**, G.J. Funke, D.R. and Case, C.L.(2007). Microbiology . 3rd ed . pearson Education Inc. USA.
- **Totir**, M.A. ; Helfand, M.S. and Carey, M.P. (2007). Sulbactam forms only minimal amounts of irreversible acrylate-enzyme with SHV-1 beta-lactamase. Biochemistry ,46 (31) : 8980-7.

- **Trevorse,** J.T. (1986) . Plasmid curing in bacteria . FEMS. Microbiol . Rev . ,32 : 149–157.
- **Turnidge**, J.; Bell, J. and Biedenbach, D.J. (2002). Pathogen occurrence and antimicrobial resistance trends among urinary tract infection isolates in the Asia-Western. Int-J-Antimicrob-Agents; vol.20(1) : 7-10.
- **Udo**,E.E;and Jacob,L.E.(2000).Characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* fom Kuwait hospitals with high level fusidic acid resisrance .J.Med .Microbiol.,49(5):419-26.
- **Ueda,** Y. & Sunagawa, M.(2003). In vitro and in vivo activity of novel 2-(thiazol-2-ylthio)-1-beta-methylcarbapenemeswith potent activity against multiresistant gram-positive bacteria. Antimicrob. Agents Chemother. Aug.47 (8): 2471-8.
- **Valls,** M.; Cases, I. and Lorenzo, V. (2004). Transcription mediated by rpon-Dependent promoters. *Pseudomonas,* Pp: 398-308.
- **Vandepitte**, J.; Engback, K.; Piot, P. and Heuck, G. (1991). Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. WHO Switzerland.
- **Van-Daele**, P.L. ; Quero-Guillen, J.C. ; Lesterhuis, W.; & Van-Der-Menlen, J.(1998). Hyperammonemia In Hydronephrosis. Ned.Tijdschr-Geneesked. 142: 2414-5 (Abstract).
- **Vianelli** N, Giannini MB, Quartic C. (2006). Resolution of a *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a haematology unit with the use of disposable sterile water filter. Haematol J ; 91 (7): 983-985.
- **Vivian**, A. ; J. Murillo and A. W. Jackson. (2001). The Roles of Plasmids in phytopathogenic bacteria : mobilearsenals J. Microbiology. 147 : 763 – 780.
- **Walled** (2003). (http://www.Olom.net.).
- **Walsh,** C. (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. Nature. 406:775–81.
- **Wariso**, B. A. and Ibe, S. N. (2006). Bacteriology of chronic discharging ears in porthar court Nigeria. West Afr. J. Med. 25(3): 219-22.
- **Weideman**, B.; Klieloe; C.; Kreskn, M. (1989). The epidemiology of β -lactamases. J. Antimicrob. Chemother. 24 (suppl B): 1-22.

- **Wesley**, W.E. (2004). Urinary tract infection. (http://www.emedicine.com).
- **WHO**. (1978). Techniques For The Detection Of β -Lactamase Producing Strains Of *Neisseria gonorrhoeae.* 616: 137-143.
- **Wilderman** ,J.P.;Vasil, I.A.; Jaohanson, Z. ; Wilson, J.M. ; Cunliffe, E.H. ; Camont, L.I. ;and Vasil, L.M. (2001). Characterization of an endoprotease (prpl) encoded by *pvds*-regulated gene in *P.aeruginosa* . J.Microbiol.18:242-249.
- **Williams**, P.; Camara, M.; Hardman, A.; Swift, S.; Milton, D.; Hope, V. J.; Winzer, K.; Middleton, B.; Pritchard, D. I. and Bycroft, B. W. (2000). Quorum sensing and the population dependent control of virulence. Philos. Trans. R. Soc. London. B. Biol. Sci. 355: 667- 680.
- **Winokur**, P.L.; Canton, R.; Casellas, J-M.; Legakis, N.(2001). Variations in the performance of strains expressing an extended-spectrum β - Lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. Clinical Infections Diseases. 32(Suppl 2): S94-103.
- **Wright**, G.D.(2003). Mechnisms of resistence to antibiotics . Curr. Opin. Chem. Biol. 7:563-9.
- **Wychoff,** J. T.; Thomas, B.; Hassett, J. D. and Wozniak, J. D. (2002). Static growth of mucoid *P. aeruginosa* selects for non-mucoid variants that have acquired flagellum-dependent motility. J. Microbiol. 148: 3423-3430.
- **Yamane**, K. ; Doi, Y. ; Yokoyama, K. ; Yagi, T. ; Kurokawa, H. ; Shebata, N. ; Shibayama, K. ; Kato, H. and Arakawa, Y. (2004). Genetic environments of the rmt A gene in *P. aeruginosa* clinical isolates . J. Antimicrobiol. Chemother.48 : 2069-2074.
- **Yan** , J.J. ; Hsueh, P.R. ; Ko, W.C. ; Luh, K.T. ; Tsai, S.H. ; Wu, H.M. and Wu, J.J. (2006). Metallo-beta-lactamase in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM -3 , a novel variant of the VIM-2 enzyme . Antimicrob . AgentsChemother . 45:2224-2228.
- **Zgurskaya**, H. I. and Nikaido, H. (1999). Bypassing the periplasm : reconstitution of the AcrAB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 7190 – 7195.

- **ملحق1 (إستمارة المعلومات الخاصة بالمرضى)**

- رقم العينة .
- اسم المريض .
- العمر .
- الجنس .
- السكن .
- نوع العينة .
- تاريخ جمع العينة .
- مكان العزل .
- معرفة هل تناول المريض مضادات حيوية ام لا .
-
-
-
-
-
-
-

نتائج تشخيص بكتريا 2ملحق (*P.aeruginosa*) بنظام Api 20NE

Tests	Active Ingredients	Reactions/Enzymes	Results	
			Negative	Positive
NO_3	Potassium nitrate	Reduction of nitrates to nitrites	NIT1+NIT2/5min	
			Colorless	Pink-red
		Reduction of nitrates to nitrogen	Zn/5min	
			Pink	colorless

TRP	L-tryptophane	Indole production	James/immediate	
			Colorless Pale green/yellow	pink
GLU	D-glucose	Fermentation(glucose)	Blue to green	yellow
ADH	L-arginine	Arginine dihydrolase	Yellow	Orange/pink
URE	Urea	Urease	Yellow	Orange/pink
ESC	Esculin ferric citrate	Hidrolysis(β-glucosidase)Esculin	Yellow	Grey/brown black
GEL	Gelatin(bovine origin)	Hydrolysis (protease)	No pigment diffution	Diffution of black pigment
PNPG	4-nitrophenyl-βD-glactopytanoside	β-glactosidase(para-nitrophenyl-βD-galactopyranosidase)	Colorless	yellow
GLU	D-glucose	Assimilation (glucose)	Transparent	opaque
ARA	L-arabinose	Assimilation(arabinose)	Transparent	opaque
MNE	D-mannose	Assimilation(mannose)	Transparent	opaque
MAN	D-mannitole	Assimilationmannitole)	Transparent	opaque
NAG	N-acetyl-glucosamine	Assimilation(N-Acetyl-Glucosamine)	Transparent	opaque
MAL	D-mallose	Assimilation(maltose)	Transparent	opaque
GNT	Potassium gluconate	Assimilation(potassium gluconate)	Transparent	opaque
CAP	Capric acid	Assimilation(capric acid)	Transparent	opaque
ADI	Adipic acid	Assimilation(adipic acid)	Transparent	opaque
MLT	Malic acid	Assimilation(malate)	Transparent	opaque
CIT	Trisodium citrate	Assimilation(trisodum citrate)	Transparent	opaque
PAC	Phenylacetic acid	Assimilation(phenylacitic acid)	Transparent	opaque
OX	(See oxidase test package insert)	Cytochrome oxidase	(see oxidase test pakage insert)	

❖

❖

❖ مقاومة عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*) للمضادات الحيوية 3ملحق (

المختلفة.

OF	CAZ	NOR	CIP	AK	TB	CN	SXT	PRL	CTR	CTX	PY	CL	FT	AX	AM	العزلة
S	R	I	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU
S	R	R	R	I	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	PU
S	R	S	S	I	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	PU
S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R	R	R	R	PU
S	R	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU
S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU
S	S	R	S	S	I	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU
S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU
S	R	S	S	S	I	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	PU
R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU
S	R	R	S	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	PU
S	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU
S	R	S	S	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	PU
S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU
S	S	R	S	S	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU
S	R	S	R	R	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU
S	R	S	R	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU
S	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU
S	R	R	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU
S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU
S	R	R	S	S	S	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	PU
S	R	S	S	S	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU
S	R	R	S	S	S	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	PU
S	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU
S	R	S	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU
S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU
S	R	R	S	S	R	I	R	S	R	R	R	R	R	R	R	PU
S	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU

S	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU
S	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU
S	R	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	PU
S	S	R	I	R	I	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	PE
S	S	S	I	S	I	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	PE
S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	PE
S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	PE
S	S	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PE
S	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PE
S	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	PE
S	R	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PE
S	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PE
S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PE
S	R	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	PE
S	S	R	R	R	R	I	R	R	R	S	R	R	R	R	R	PE
S	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PE
S	S	R	S	R	R	R	R	S	R	R	I	R	R	R	R	PE
S	R	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	R	R	R	R	PE
S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PE
S	R	R	R	S	S	I	R	S	R	R	R	R	R	R	R	PE
S	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PE
S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	PE
S	R	R	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	PW
S	R	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	PW
S	S	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	PW
S	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	PW
S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	PW
S	R	R	R	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	PW
S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	PW
S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PW
S	R	R	S	S	S	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	PW
S	S	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PW
S	S	R	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PW
S	S	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PW

S	R	R	S	S	R	I	R	S	R	S	R	R	R	R	R	PW
S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PV
S	S	S	S	R	I	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PB
S	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PB
S	R	R	S	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PB
S	S	R	I	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PB
S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PB
S	R	S	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PB
R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PB
S	R	S	S	S	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PB
S	R	S	R	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PB
S	R	S	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PB
S	R	S	S	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PB

❖

❖ S - Sensitive حساسة /

❖ I - Intermediate متوسطة /

❖ R - Resistant مقاومة /

❖

❖

❖

❖

❖

❖

❖

❖

❖

❖

❖

❖ يبين التأثير الخلطي لمثبط 4ملحق(Clavulanic acid Amoxicillin +)

❖ وبنسبة (١ : ٢) (Augmentin)

Clavulanic acid + Amoxicillin µg/ml	Amoxicillin µg/ml	رقم العزلة	Clavulanic acid + Amoxicillin µg/ml	Amoxicillin µg/ml	رقم العزلة
256	1024	PE41	64	1024	PU1
512	١٠٢٤	PE47	8	٥١٢	PU5

64	٥١٢	PW51	64	١٠٢٤	PU7
8	٥١٢	PW52	512	١٠٢٤	PU10
32	512	PW54	128	1024	PU14
128	1024	PW55	16	٥١٢	PU17
16	٥١٢	PW60	512	١٠٢٤	PU20
128	٥١٢	PW63	١٦	512	PU25
16	١٠٢٤	PW64	128	٥١٢	PU26
512	١٠٢٤	PW65	128	١٠٢٤	PE28
512	١٠٢٤	PW66	128	١٠٢٤	PE32
256	١٠٢٤	PW67	32	512	PE33
16	١٠٢٤	PB70	١٢٨	١٠٢٤	PE34
256	١٠٢٤	PB71	16	512	PE35
8	512	PB72	128	1024	PE36
256	1024	PB73	64	512	PE37
256	١٠٢٤	PB74	256	١٠٢٤	PE39

❖

❖

❖

❖

❖

❖

❖ ملحق 5(يبين التأثير الخلطي لمثبط Clavulanic acid + Cephalexin)

❖ : ١) وبنسبة 4)

Clavulanic acid + Cephalexin µg/ml	Cephalexin µg/ml	رقم العزلة	Clavulanic acid + Cephalexin µg/ml	Cephalexin µg/ml	رقم العزلة
256	512	PE41	128	512	PU1
512	١٠٢٤	PE47	2	128	PU5

64	٥١٢	PW51	128	١٠٢٤	PU7
4	128	PW52	128	١٠٢٤	PU10
32	512	PW54	64	1024	PU14
4	256	PW55	8	٥١٢	PU17
256	٥١٢	PW60	256	512	PU20
4	256	PW63	4	256	PU25
256	١٠٢٤	PW64	128	٥١٢	PU26
8	512	PW65	256	١٠٢٤	PE28
256	١٠٢٤	PW66	128	١٠٢٤	PE32
128	512	PW67	4	512	PE33
256	١٠٢٤	PB70	256	512	PE34
256	١٠٢٤	PB71	16	512	PE35
8	512	PB72	256	1024	PE36
64	512	PB73	8	512	PE37
4	256	PB74	256	١٠٢٤	PE39

❖

❖

❖

❖

❖

❖ ملحق (6 يبين التأثير الخلطي لمثبط Clavulanic acid + Carbencillin)

❖ وبنسبة (١ : 4)

Clavulanic acid + Carbencillin µg/ml	Carbencillin µg/ml	رقم العزلة	Clavulanic acid + Carbencillin µg/ml	Carbencillin µg/ml	رقم العزلة
256	1024	PE41	256	1024	PU1
512	١٠٢٤	PE47	16	٥١٢	PU5
64	٥١٢	PW51	64	١٠٢٤	PU7

8	128	PW52	256	١٠٢٤	PU10
32	512	PW54	256	1024	PU14
256	1024	PW55	32	٥١٢	PU17
256	٥١٢	PW60	256	512	PU20
256	٥١٢	PW63	١٦	512	PU25
256	١٠٢٤	PW64	128	٥١٢	PU26
512	١٠٢٤	PW65	256	١٠٢٤	PE28
256	١٠٢٤	PW66	256	١٠٢٤	PE32
64	١٠٢٤	PW67	32	512	PE33
256	١٠٢٤	PB70	256	512	PE34
256	١٠٢٤	PB71	16	512	PE35
8	512	PB72	256	1024	PE36
16	1024	PB73	8	64	PE37
256	١٠٢٤	PB74	256	١٠٢٤	PE39

❖

❖

❖

❖

❖

❖ يبين التأثير الخلطي لمثبط 7ملحق(Clavulanic acid Cefotaxime +)

❖ : ١) وبنسبة4(

Clavulanic acid + Cefotaxime µg/ml	Cefotaxime µg/ml	رقم العزلة	Clavulanic acid + Cefotaxime µg/ml	Cefotaxime µg/ml	رقم العزلة
256	512	PE41	16	256	PU1
512	١٠٢٤	PE47	4	32	PU5
16	256	PW51	32	512	PU7
2	16	PW52	16	512	PU10

32	512	PW54	8	128	PU14
4	256	PW55	8	256	PU17
16	٥١٢	PW60	128	512	PU20
4	256	PW63	16	256	PU25
32	١٠٢٤	PW64	128	٥١٢	PU26
8	32	PW65	64	512	PE28
16	١٠٢٤	PW66	2	16	PE32
128	512	PW67	4	32	PE33
128	١٠٢٤	PB70	8	512	PE34
64	512	PB71	16	512	PE35
8	512	PB72	16	256	PE36
64	512	PB73	4	16	PE37
4	256	PB74	32	512	PE39

❖

❖

❖

❖

❖

❖

❖

❖ يبين التأثير الخلطي لمثبط 8ملحق (Clavulanic acid Ceftriaxone +)

❖ وبنسبة (١ : 4)

Clavulanic acid + Ceftriaxone µg/ml	Ceftriaxone µg/ml	رقم العزلة	Clavulanic acid + Ceftriaxone µg/ml	Ceftriaxone µg/ml	رقم العزلة
256	512	PE41	4	32	PU1
512	١٠٢٤	PE47	4	128	PU5
16	256	PW51	2	64	PU7
2	16	PW52	64	512	PU10
32	512	PW54	8	128	PU14
4	256	PW55	8	256	PU17

16	٥١٢	PW60	128	512	PU20
4	256	PW63	16	256	PU25
32	١٠٢٤	PW64	128	٥١٢	PU26
8	32	PW65	2	16	PE28
16	١٠٢٤	PW66	16	64	PE32
16	512	PW67	4	32	PE33
٥١٢	١٠٢٤	PB70	8	512	PE34
64	512	PB71	4	16	PE35
8	512	PB72	8	128	PE36
16	512	PB73	4	16	PE37
4	16	PB74	32	512	PE39

❖ يبين التأثير الخلطي لمثبط 9ملحق (❖ Clavulanic acid Ceftazidime +)

❖ وبنسبة (١ : 4❖)

Clavulanic acid + Ceftazidime µg/ml	Ceftazidime µg/ml	رقم العزلة	Clavulanic acid + Ceftazidime µg/ml	Ceftazidime µg/ml	رقم العزلة
8	512	PE41	4	16	PU1
4	256	PE47	4	128	PU5
2	16	PW51	1	16	PU7
2	16	PW52	16	256	PU10
32	64	PW54	8	128	PU14
1	16	PW55	8	256	PU17
1	8	PW60	4	512	PU20
4	256	PW63	2	128	PU25

4	128	PW64	1	256	PU26
2	16	PW65	2	16	PE28
1	128	PW66	16	64	PE32
16	512	PW67	4	32	PE33
1	256	PB70	8	128	PE34
2	512	PB71	4	16	PE35
1	16	PB72	2	16	PE36
4	128	PB73	4	512	PE37
4	16	PB74	2	16	PE39

❖

❖

❖

❖

❖

❖

❖

❖ Clavulanic acid Piperacillin +) يبين التأثير الخلطي لمثبط 10ملحق(

❖)4وبنسبة (١ :

Clavulanic acid + Pipracillin µg/ml	Pipracillin µg/ml	رقم العزلة	Clavulanic acid + Pipracillin µg/ml	Pipracillin µg/ml	رقم العزلة
256	512	PE41	4	64	PU1
256	512	PE47	4	256	PU5
2	64	PW51	2	32	PU7
2	32	PW52	256	512	PU10
32	512	PW54	16	128	PU14
32	32	PW55	32	256	PU17
32	64	PW60	4	512	PU20
4	256	PW63	2	128	PU25
256	512	PW64	32	256	PU26
2	64	PW65	2	64	PE28

16	256	PW66	16	256	PE32
16	512	PW67	4	32	PE33
64	256	PB70	4	64	PE34
256	512	PB71	8	64	PE35
32	64	PB72	8	256	PE36
16	256	PB73	16	256	PE37
4	256	PB74	16	512	PE39

❖
❖
❖
❖
❖
❖
❖
❖

❖ يبين التأثير الخلطي لمثبط 11ملحق(Piperacillin Tazobactam +)

❖ (Tazocin) وبنسبة (١ : 8)

Tazobactam + Pipracillin µg/ml	Pipracillin µg/ml	رقم العزلة	Tazobactam + Pipracillin µg/ml	Pipracillin µg/ml	رقم العزلة
64	512	PE41	4	64	PU1
256	512	PE47	4	256	PU5
2	64	PW51	2	32	PU7
2	32	PW52	256	512	PU10
32	512	PW54	16	128	PU14
32	32	PW55	32	256	PU17
32	64	PW60	4	512	PU20
4	256	PW63	2	128	PU25
256	512	PW64	32	256	PU26
2	64	PW65	2	64	PE28
16	256	PW66	16	256	PE32
16	512	PW67	4	32	PE33

64	256	PB70	4	64	PE34
64	512	PB71	8	64	PE35
32	64	PB72	8	256	PE36
16	256	PB73	16	256	PE37
4	256	PB74	16	512	PE39

❖

❖

❖

❖

❖

❖

❖

❖ التحليل الأحصائي بأستخدام برنامج 12ملحق (SPSS)

❖ أختبار t (t-test)

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation
Pair 1	A1	798.12	34	258.045
	A2	171.29	34	175.427
Pair 2	A3	828.24	34	252.554
	A4	163.53	34	169.307
Pair 3	A5	773.65	34	301.576
	A6	180.47	34	138.118
Pair 4	A7	640.00	34	308.748
	A8	129.24	34	126.420
Pair 5	A9	414.59	34	292.686
	A10	52.82	34	98.042
Pair 6	A11	359.06	34	318.425
	A12	46.29	34	98.095
Pair 7	A13	157.41	34	173.075
	A14	5.26	34	6.326
Pair 8	A15	244.71	34	183.722
	A16	50.12	34	87.832
Pair 9	A17	244.71	34	183.722
	A18	38.82	34	70.892

❖

Paired Samples Test

		t	df	Sig. (2-tailed)
Pair 1	A1 - A2	17.241	33	.000
Pair 2	A3 - A4	18.666	33	.000
Pair 3	A5 - A6	14.088	33	.000
Pair 4	A7 - A8	12.120	33	.000
Pair 5	A9 - A10	8.241	33	.000
Pair 6	A11 - A12	6.542	33	.000
Pair 7	A13 - A14	5.151	33	.000
Pair 8	A15 - A16	7.817	33	.000
Pair 9	A17 - A18	7.654	33	.000