التحري عن الجين $bla_{CTX-M-1}$ وعوامل الضراوة والمقاومة المتعددة للمضادات الحياتية في بكتريا *Psuedomonas aeruginosa*

هادي رحمن رشيد الطائي [1] ، زينب محمد حميد [2] و ازدهار محمد جاسم [3]

[1، 2، 3] قسم علوم الحياة - كلية العلوم - جامعة ديالى- محافظة ديالى – العراق

الخلاصة

تضمنت الدراسة جمع 176 نموذج من اخماج الحروق والجروح واخماج الاذن والمجاري البولية ، من مختلف الاجناس والاعمار، ومن مرضى راقدين و غير راقدين في المستشفى ، اظهرت النتائج ان عدد بكتريا الزائفة الزنجارية هو 20 عزلة بنسبة 11.36% بعد اجراء الفحوصات البكتيرية والكيموحيوية بأستخدام جهاز VITEK 2 لتشخيص العزلات البكتيرية. اجري اختبار الحساسية لثمانية مضادات واظهرت العزلات مقاومتها لمضادات مجموعة السيفالوسبورينات بشكل متفاوت . بلغت نسبة المقاومة للمضادات Ceftazidime ، Cefotaxime ، Cephalexin ، Cephalothin 90% ، 25% ، 100% ، 100% ، على التوالي .وحُدد التركيز المثبط الادنى MIC للمضادين Cefotaxime وCeftazidime، اذ تراوح التركيز المثبط الادنى MIC لمضاد Ceftazidime ومضاد Cefotaxime 8-1024 ، 8-512 مايكروغرام/مل على التوالي .كما اجري الكشف عن انتاج العزلات البكتيرية لانزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ، اذ بلغت نسبة العزلات المنتجة لانزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف 55% . اجري الكشف عن وجود الجين *bla* CTX-M-1 ، اذ بلغت نسب العزلات الحاملة للجين 72.7%. هذا وقد تم الكشف عن بعض عوامل الضراوة التي شملت الكشف عن تكوين الاغشية الحيوية والكشف عن وجود مضخات الدفق ، واظهرت 100% من العزلات قابليتها على تكوين الاغشية الحيوية ، وامتلكت 95% منها انظمة دفق.

الكلمات المفتاحية : بكتريا *P.aeruginosa* ، المقاومة الدوائية المتعددة ، جين $bla_{CTX-M-1}$ ، انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف.

DIYALA JOURNAL FOR PURE SCIENCES

التحري عن الجين $bla_{CTX-M-1}$ وعوامل الضراوة والمقاومة المتعددة للمضادات الحياتية في بكتريا *Psuedomonas aeruginosa*

هادي رحمن رشيد الطائي ، زينب محمد حميد و ازدهار محمد جاسم

Investigation on *bla* $_{Ctx-M-1,}$ Virulence Factors and Multidruge Resistance in *Pseudomonas Aeruginosa* Bacteria

Hadi Rahman Rasheed Al-Taai [1], Zainab Mohammed Hameed [2] and Izdehar Mohammed Jasim[3]

[1, 2, 3] Biology Department - College of Science - Diyala University
[1] drhadialtaai@yahoo.com
[2] zainab_mohammed19@yahoo.com
[3] otulibaflower@yahoo.com

Received: 2 December 2016 **Accepted: 9 January 2017**

Abstract

One hundred seventy six clinical specimens were included in this study. These specimens included burns, wounds, ear and urinary tract infections from different ages and sex and from resident and out patients in the hospital . Twenty isolates of *P. aeruginosa* were recovered (11.36%) after do bactereiological and biochemical tests by using VITEK 2 compact .The antibiotic susceptibility patterns for 8 antibiotics were carried, the antibiotic resistance of *P. aeruginosa* isolates to cephalosporines was appeared to be variable, so that the resistant rate to Ceftazidime, Cefatoxime, , Cephalothin and Cephalexin were 90%, 25%, 100% and 100% respectively. The minimum inhibitory concentrations (MIC) of the Cefotaxime and Ceftrazidime were determined by serial double dilutions technique The MIC for Cefatoxime was 8-512, and for Ceftazidime was 8-1024. All *P. aeruginosa* isolates were investigated for detection of broad spectrum β-lactamases, 55% of the isolates were appeared to have the ability for broad spectrum β-lactamases. The detection of the presence of *bla* $_{CTX-M-1}$ was done , the isolates possession rate for *bla* $_{CTX-M-1}$ was 72.7%. Furthermore , the production of virulence factors which include the ability for the biofilms formation and the detection of efflux pumps were done , 100% of the isolates were biofilms former, and 95% of the isolates possess the efflux pumps.

Key words: *P.aeruginosa* ,MDR, *bla* $_{CTX-M-1}$, ESβLs

التحري عن الجين $bla_{CTX-M-1}$ وعوامل الضراوة والمقاومة المتعددة للمضادات الحياتية في بكتريا *Psuedomonas aeruginosa*

هادي رحمن رشيد الطائي ، زينب محمد حميد و ازدهار محمد جاسم

المقدمة

تعد بكتريا الزائفة الزنجارية *P.aeruginosa* من الانواع البكتيرية الممرضة الانتهازية والخطيرة على الصحة العامة للبشر ، اذ تعتبر من المسببات الشائعة المسؤولة عن الكثير من الاخماج عند المرضى الراقدين في المستشفيات وبدرجة اقل عند مراجعين العيادات الخارجية (Paterson,2006) . تمتلك بكتريا الزائفة الزنجارية عدداً كبيراً من عوامل الضراوة التي تجعلها مسؤولة عن العديد من الاصابات التي تصيب البشر، منها تكوين الاغشية الحيوية وانتاج السموم والانزيمات التي تسبب تلف واسع النطاق في الانسجة وبالتالي الوصول الى المجرى الدموي ، مسبباً انتشار هذه البكتريا في انسجة الجسم .(Cotar *et al.*,2010; Mohammad,2013) تمثل الزائفة الزنجارية *P.aeruginosa* ظاهرة من المقاومة للمضادات الحياتية ، اذ تعود صعوبة معالجة الاصابات التي تسببها الى عمق المقاومة الدوائية في هذا النوع من البكتريا، اذ تمتلك مقاومة طبيعية منها تغيير نفوذية الجدار الخارجي (Breidenstein *et al.*,2011)، وامتلاكها عدة مجاميع من انظمة الدفق (Morita *et al.*,2012) . كما تنتج بكتريا الزائفة الزنجارية العديد من الانزيمات المسؤولة عن تحلل العديد من المضادات الحياتية وخصوصاً مضادات مجموعة البيتالاكتام كأنزيمات البيتالاكتاميز المعدنية Metallo β-Lctamases(MβLs) وانزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف Extended Spectrum β-Lactamases(ESβLs) وانزيمات الصف الجزيئي لامبلر Ampler Molecular Class (AMPC) (Gellatly & Hancock,2013;Park *et al.*,2014) ، اذ ان التعرض المستمر والعشوائي لمضادات البيتالاكتام على الخلية البكتيرية وفي المقابل انتاجها المستمر لانزيمات البيتالاكتاميز β-lactamases ادى الى حدوث العديد من الطفرات في المورثات المشفرة لانتاجها مما سبب في ظهور جينات مقاومة مشفرة لانتاج انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف التي تمنح صفة المقاومة للخلية البكتيرية تجاه الكثير من مجاميع مضادات البيتالاكتام كالبنسلينات،السيفالوسبورينات (للعديد من اجيالها) ومضادات الكاربابينيم (Strateva&Yordanov,2009; Rezai *et al.*,2014). حديثاً تم اكتشاف عائلة CTX-M التابعة لانماط انزيمات ESβLs، اذ تم عزل انزيم *bla* $_{CTX-M-1}$ من بكتريا الزائفة الزنجارية المعزولة من المرضى الراقدين في مستشفى الكاظمية التعليمي في مدينة بغداد والمصابين بإلتهابات الاذن الوسطى عام 2013 ، اذ تم عزل الجين *bla* $_{CTX-M1}$ من بلازميدات البكتريا (Aude *et al.*, 2013) . نظراً لاهمية الدراسات الخاصة بتحديد انواع بكتريا *Pseudomonas* المقاومة لمضادات البيتالاكتام والمسببة لاخماج سريرية مختلفة بين الراقدين وغير الراقدين في مدينة بعقوبة جاءت هذه الدراسة لتسلط الضوء على تشخيص عزلات *Pseudomonas* والكشف عن مقاومة العزلات المحلية لبعض مضادات البيتالاكتام ، وتحديد التركيز المثبط الادنى (MIC) لبعض هذه المضادات ، الكشف عن عوامل الضراوة المنتجة من العزلات والتي تضمنت (الكشف عن انتاج الاغشية الحيوية، انتاج انزيمات البيتالاكتاميز و الكشف عن مضخات الدفق) والكشف عن وجود الجين *bla* $_{CTX-M-1}$ ، المشفر لانزيمات البيتالاكتاميز المحطمة لمضادات البيتالاكتام.

طرائق العمل

1. جمع العينات Collection of Samples

جمعت 176 عينة من حالات مرضية مختلفة وتضمنت 11 عينة من مسحات الحروق ، و 16 عينة من مسحات الجروح و 112 عينة من مسحات الاذن و37 عينة ادرار ، بإستعمال Disposable Cotton Swabs و قناني بلاستيكية معقمة لجمع عينات الادرار الوسطي. زرعت العينات مباشرة بعد الجمع على وسط اكار الدم ووسط ماكونكي ، وتم تنقية العزلات على وسط *Pseudomonas* agar ، بعدها اجريت عدد من الفحوصات التشخيصية المظهرية والكيموحيوية للبكتريا المعنية بالدراسة وحسب ما جاء في .(Baron *et al*.,2007; Pincus,2011)

2. فحص الحساسية للمضادات الحياتية Antibiotic suscepitibility test

اجري اختبار حساسية البكتريا لمضادات البيتالاكتام بالاعتماد على طريقة Kerby- Bauer method على وسط اكار مولر-هنتون وقد تم مقارنة اقطار التثبيط بحسب ماورد في (CLSI,2014) .

3. تحديد التركيز المثبط الادنى Detection of Minimal - Inhibitory Concentration حدد التركيز المثبط الادنى (MIC) لكل العزلات البكتيرية وفقاً للمعايير القياسية ل (CLSL ,2014)

4. اختبار الكشف المظهري عن مضخات الدفق Detection of efflux pumps test

اختبرت العزلات قيد الدراسة عن امتلاكها لمضخات الدفق Efflux pumps بأستخدام طريقة العجلة الخشبية EtBr- agar Cart Wheel Method بحسب ما جاء في (Martins *et al* ., 2011).

5.الكشف عن تكوين الاغشية الحيوية Detection of Biofilm formation

استخدمت طريقة الصفيحة الدقيقة Micro Titer Plate (MTP) وحسب ما جاء في (Almeida *et al*.,2013;Tang et al.,2011).

6. الكشف انتاج أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف Extended Spectrum β- Lactamase (ESβLs)

تم استخدام طريقة الاقراص المدمجة Combined disk Test (CDT) للكشف عن أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف وذلك بحسب ما جاء في (CLSI ,2011).

7. أستخلاص الحامض النووي DNA بكتريا الزائفة الزنجارية *P.aeruginosa* DNA extraction

تم عزل DNA العزلات البكتيرية المقاومة لمضادات السيفالوسبورينات بأستخدام عدة استخلاص DNA المجهزة من شركة Bioneer (Korea) ورحلت نتائج الاستخلاص بأستعمال هلام الاكاروز 1% لمدة ساعة و30 دقيقة وبفرق جهد 75 فولت /سم وكما جاء في (Russel & Sambrook,2001).

8. الكشف عن الجين *bla* CTX-M-1 gene Detection of $bla_{CTX-M-1}$

اختيرت البوادئ النوعية المستهدفة لجين *bla* CTX-M-1 في بكتريا الزائفة الزنجارية *P.aeruginosa* ووفقاً لما ذكر في (Tavajjohi *et al*.,2011) ، اذ كان تتابع البادئ 3- F/5-GCGATGTGCAGCACCAGTAA للامام و

R/ 5-GGTTGAGGCTGGGTGAAGTA -3 للخلف وبحجم 605 زوج قاعدي ، اذ تم تحضير المحاليل الخزينة حسب تعليمات شركة Bioneer المجهزة لها بإستعمال الماء مزال الايونات ddH2O المعقم للحصول على تركيز 100 بيكومول/مايكرولتر. وقد تم اجراء التفاعل التضاعفي حسب ما ورد في (Lalzmapuia &Dutta,2013)وكما موضح في الجدول رقم (1).

جدول (1): ظروف التجربة ومراحلها الثلاث في جهاز تفاعل البلمرة التسلسلي PCR

Gene	Initial denaturation	No of cycle	Denaturation	Annealing	Extension	Final Extension
$bla_{CTX-M-1}$	7min. at 94c	30	30s at 94c	30s at 57c	30s at 72c	5min. at72c

9. التحليل الاحصائي: Statiatical analysis

اجري التحليل الاحصائي باستخدام برنامج الحزمة الاحصائية للعلوم الاجتماعية (Statistical package for social sciences) ذي الاصدار رقم 22 فيما يتعلق بالمتغيرات ذات الصيغة الوصفية فقد تم وصفها بصيغة العدد والنسبة المئوية وتمت المقارنة بين البيانات الوصفية باستخدام اختبار Chi-Square كما تم استخدام t-test للمقارنة بين البيانات العددية واعتبرت كل قيمة *P* value اقل من 0.05 > معنوية احصائياً (Levesque,2007).

النتائج والمناقشة

1. عزل وتشخيص الزائفة الزنجارية Isolation and Identification of *P.aeruginosa*

تم الحصول على 20 عزلة بكتيرية (11.36%) من مجموع 176 عينة بالاعتماد على الصفات المظهرية والتشخيص بنظام VITEK2، بواقع (13) عزلة من اخماج الاذن و(4) عزلات من عينات الادرار و(2) عزلة من مسحات الحروق و(1) عزلة من مسحات الجروح ، اذ بلغت نسبة العزلات التي حصلنا عليها من اخماج الحروق والاذن والمجاري البولية والجروح (18.18%) ، (11.60%) ، (10.81%) ، (6.25%) على التوالي وبفارق احصائي معنوي عالي جدا (*P* =0.0001) .

2. حساسية العزلات البكتيرية للمضادات الحياتية وتحديد التركيزالمثبط الادنى Antibiotics and Sensitivity Test minimal inhibitory concentration to

اختبرت حساسية العزلات قيد الدراسة لثمانية مضادات حياتية من مجموعة البيتالاكتام معظمها من الانواع الشائعة الاستخدام في القطر لعلاج الاخماج المختلفة ، بلغت نسبة المقاومة للمضادات Ceftazidime ، Cefotaxime ، Cephalexin

100% ، 100% ، 25% ، 90%) Piperacillin ، Ticarcillin ، Aztreonam ، Imipenem ، Cephalothin ، 0%، 5% ، 25% ، 20%) على التوالي. اتفقت نتيجة الدراسة الحالية مع نتيجة الباحث الهندي Shaikh وزملاؤه عام 2015 ، اذ بلغت نسبة عزلات الزائفة الزنجارية المقاومة لمضاد Ceftazidime ، 91.49%(Shaikh *et al*.,2015) . خالفت هذه النتائج نتائج الباحث الهندي Shaikh وزملاؤه عام 2015 ، اذ كانت نسبة مقاومة عزلات الزائفة لمضاد Cefotaxime 91.49 % (Shaikh *et al*.,2015).توافقت نتائج هذه الدراسة مع نتائج دراسة (Abdullah *et al*.,2010) ، إذ كانت جميع العزلات البكتيرية مقاومة لمضاد Cephalexin وبنسبة 100% ، كما توافقت نتائج هذه الدراسة مع ما توصلت اليه الباحثة الصفار عام 2010، اذ بلغت نسبة مقاومة العزلات لمضاد Cephalothin 100% (الصفار ، 2010)، و اتفقت هذه الدراسة مع دراسة Haenni واخرون عام 2015، اذ بلغت نسبة مقاومة عزلات الزائفة الزنجارية لمضاد Imipenem 0% (Haenni *et al*.,2015).خالفت نتائج هذه الدراسة نتائج دراسة الباحث Almarjani واخرون عام 2015 ، اذ كانت نسبة مقاومة عزلات الزائفة الزنجارية لمضاد Aztreonam 18.5% ، (Almarjani *et al*.,2015). توافقت نتيجة هذه الدراسة مع دراسة Essawi وزملاؤها عام 2013 ، اذ كانت نسبة مقاومة عزلات الزائفة الزنجارية لمضاد Ticarcillin 22.5%(Essawi *et al*.,2013) ، وتوافقت نتيجة هذه الدراسة مع دراسة Ansari واخرون عام 2015 ، اذ بلغت نسبة عزلات *P.aeruginosa* المقاومة لمضاد Piperacillin 16.1% (Ansari *et al*.,2015) . نلاحظ في هذه الدراسة إرتفاع نسبة مقاومة عزلات الزائفة الزنجارية تجاه مضادات السيفالوسبورينات والبنسلينات مثل مضاد Ceftazidime وCephalothin وCephalexin وPiperacillin و Ticarcillin ، اذ ابدت جميع عزلات بكتريا الزائفة الزنجارية مقاومة متعددة لمضادات البيتالاكتام ، تراوحت المقاومة من ثلاثة الى ستة مضادات ، يعود ذلك الى قدرة الزائفة الزنجارية على انتاج انزيمات البيتالاكتاميز كأنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESβLs والتي تعمل على تحليل البنسلينات والسيفالوسبورينات بشكل خاص ، والتي تكون جيناتها محمولة اما على الكروموسومات او على البلازميدات في العديد من انواع البكتريا والذي يؤدي الى مقاومة متعددة للمضادات الحياتية المختلفة ، بالاضافة الى تعديل بنية البروتينات الرابطة للبنسلين PBPs والتي تعد الهدف الاساس لمضادات البيتالاكتام (Ullah *et al*.,2009;Ocampo-Sosa *et al*.,2012;Abdullah and Mahdi,2016) ، كما ان الاستخدام الواسع والعشوائي لهذه المضادات من قبل المرضى (في عدة حالات) ، قد يؤدي الى نشوء المقاومة وذلك لتوفرها وسهولة تعاطيها(عن طريق الفم) ورخص ثمنها ، اذ ان ارتفاع نسب مقاومة البكتريا بصورة عامة للمضادات الحياتية هي مشكلة من صنع الانسان وهي عالمية الانتشار ولكنها تتجلى بشكل واضح في بلدان العالم النامية مقارنة بالبلدان المتقدمة . هذا وقد حدد التركيز المثبط الادنى Minimal inhibitory concentration(MIC) لمضاد Ceftazidime و Cefotaxime لجميع العزلات البكتيرية قيد الدراسة وقد تراوحت قيم MIC (8-1024) ، (8-512) مايكروغرام/مل للمضادين على التوالي. خالفت نتائج الدراسة الحالية نتائج دراسة Fathel عام 2013 ، اذ تراوحت قيم MIC لمضاد Cefotaxime و Ceftazidime (1-64) مايكروغرام/مل (Fadhel,2013) .

3. الكشف عن عوامل الضراوة Virulence factors detection

تم الكشف عن تكوين الاغشية الحيوية واظهرت (100%) من العزلات قابليتها على تكوين الاغشية الحيوية ، اذ بلغت نسبة العزلات البكتيرية المكونة للاغشية الحيوية بشكل قوي (25%) وان (75%) من العزلات البكتيرية قد كونت الاغشية الحيوية بشكل متوسط وكما مبين في الجدول رقم (2) .خالفت نتائج الدراسة الحالية نتائج الباحثة Al-Musawi عام 2014 ، اذ كانت عزلات الزائفة الزنجارية المكونة للاغشية الحيوية وبشكل قوي 45% ، بينما بلغت نسبة عزلات الزائفة الزنجارية التي كونت الاغشية الحيوية بشكل متوسط 48.3% (Al-Musawi,2014). ربما يعود السبب في اختلاف نتائج الدراسات الى عدد العزلات او مصدرها او عدد ونوع الخلايا البكتيرية في المزرعة السائلة او الطريقة المختبرية التي تم اعتمادها للمقارنة بين الحفر المزروعة وحفر السيطرة ، اضافة الى الخصائص الفيزيائية والكيميائية للصفيحة المستخدمة .

جدول (2): قابلية انتاج الزائفة الزنجارية *P.aeruginosa* للاغشية الحيوية

مصدر العزلة	قيمة الامتصاصية للحفر المزروعة A عند طول موجي= 630nm	مستوى انتاج الاغشية الحيوية مقارنة بحفر السيطرة Ac
Pu	0.085	متوسط
Pe	0.085	متوسط
Pe	0.14	قوي
Pw	0.071	متوسط
Pe	0.080	متوسط
Pe	0.22	قوي
Pe	0.075	متوسط
Pe	0.079	متوسط
Pe	0.084	متوسط
PB	0.13	قوي
Pe	0.081	متوسط
Pe	0.08	متوسط
Pu	0.073	متوسط
Pe	0.088	متوسط
PB	0.089	متوسط
Pe	0.084	متوسط
Pu	0.098	قوي
Pu	0.087	متوسط
Pe	0.13	قوي
	Ac=0.049	قوي =25% متوسط = 75% *P* value=0.007[S]

Pe = ear swabs, Pu = urine samples, Pw = wound swab , PB = burn swabs

AC= حفر السيطرة A= الحفر المزروعة

ان للاغشية الحيوية تأثير كبير على الرعاية الصحية ، وتشكل نسبة 65% من اخماج المستشفيات (Hoiby *et al.*,2010) ، تسبب الاغشية الحيوية اصابات مزمنة ، كونها تظهر قابلية تحمل للمضادات الحياتية والمطهرات الكيميائية ومقاومة عملية البلعمة ودفاعات الجسم الاخرى وذلك لان هذه التجمعات البكتيرية تحيط نفسها بقالب صلب ولزج من عديد السكريات Extrapolysaccharide matrix الذي يستخدم لحمايتها (Davies ,2002). في مقارنة عزلات الزائفة الزنجارية الداخلة في الدراسة ، المتعددة المقاومة للمضادات الحياتية مع تكوينها للاغشية الحيوية ، تبين ان هناك علاقة بين تكوين العزلات البكتيرية للاغشية الحيوية والمقاومة المتعددة لمضادات الحياة ، اذ اظهرت جميع العزلات المكونة للاغشية الحيوية مقاومة متعددة للمضادات الحياتية MDR خاصة مضادات السيفالوسبورينات ، اذ بلغت اعلى نسب المقاومة ، وهذه النتيجة تتفق مع نتيجة دراسة Sanchez واخرون عام 2013 ، (Sanchez *et al.*,2013). بينت العديد من الدراسات ان تكوين الاغشية الحيوية مرتبط بشكل كبير مع المقاومة المتعددة للمضادات الحياتية بسبب قرب الخلايا البكتيرية من بعضها ، اذ يمنح هذا الاتصال الخلوي البكتريا قابلية انتقال البلازميدات الفعال من خلية الى اخرى (Sanchez *et al.*,2013; Gupta *et al.*,2016). اختبرت العزلات البكتيرية الداخلة في الدراسة عن امتلاكها لمضخات الدفق ، اذ استخدم مصدر للاشعة فوق البنفسجية U.V. light للكشف المظهري عن مضخات الدفق ، بلغت نسبة العزلات التي تمتلك مضخات دفق وبكفاءة عالية 85%، وان نسبة 10% من العزلات كانت تمتلك مضخات الدفق وبكفاءة متوسطة ، في حين امتلكت 5% من العزلات مضخات دفق بكفاءة ضعيفة وكما مبين في جدول رقم (3) .

جدول(3) : النسب المئوية لبكتريا الزائفة الزنجارية المنتجة والغير منتجة لمضخات الدفقEfflux pumps

عدد العزلات المنتجة لمضخات الدفق(%)	كفاءة مضخات الدفق
(85%) 17	كفاءة عالية High efflux pumps
(10%) 2	كفاءة متوسطة Intermediate efflux pumps
(5%) 1	لا تمتلك مضخات دفق Low efflux pumps
P value = 0.001	

ان نسبة العزلات البكتيرية التي تمتلك مضخات دفق بكفاءة عالية قريبة من نتائج دراسة ALMarjani في بغداد عام 2015 في الكشف عن مضخات الدفق في عزلات الزائفة الزنجارية *P.aeruginosa* ، اذ بلغت النسبة 76.6% (ALMarjani *et al.*,2015). خالفت نتائج الدراسة الحالية دراسة Suresh واخرون عام 2016 ، اذ بلغت نسبة عزلات الزائفة الزنجارية المنتجة لمضخات الدفق بكفاءة عالية 47.82% ، وبلغت نسبة العزلات الغير منتجة لمضخات الدفق 52.17% (Suresh *et al.*,2016). قد يكون تفسير اختلاف نتائج الدراسة الحالية عن نتائج دراسة Suresh ، الى اختلاف عدد العزلات البكتيرية التي اجريت عليها الدراسة ، حجم العالق الجرثومي ، تراكيز الصبغة المستخدمة ، اضافة الى الطول الموجي المستخدم في الكشف عن التعبير عن مضخات الدفق . كما اظهرت الدراسة الحالية وجود علاقة بين انتاج العزلات الداخلة في الدراسة لمضخات الدفق والمقاومة المتعددة لمضادات الحياة وكما مبين في الجدول رقم (4).

جدول (4): العلاقة بين المقاومة المتعددة في عزلات الزائفة الزنجارية ونسب انتاجها لمضخات الدفق

عدد المضادات التي قاومتها العزلات MDR	نسبة العزلات المنتجة لمضخات الدفق في العزلات متعددة المقاومة	عدد العزلات المنتجة منها لمضخات الدفق	عدد العزلات
3	90%	10	11
4	100%	5	5
5	100%	2	2
6	100%	1	1
7	100%	1	1
0.936[NS]			*P* value

اذ كلما ارتفعت نسبة انتاج العزلات الداخلة في الدراسة لمضخات الدفق كلما ارتفع عدد المضادات التي قاومتها العزلات ، اذ تلعب انظمة الدفق دوراً مهماً في تطور مقاومة البكتريا السالبة لملون غرام للعقاقير (Suresh *et al*.,2016) ، اذ تعمل انظمة الدفق على دفع المضاد الحياتي خارج الخلية البكتيرية (Pearson *et al*.,1999; Kardy,2003) .

4. الكشف عن انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESβLs

تم الكشف عن انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESβLs ، اذ اظهرت نتائج الاختبار ان 11 عزلة من العزلات الداخلة في الدراسة كانت منتجة للانزيم وبنسبة 55% ولم يكن هناك فارق احصائي معنوي وكما مبين في الجدول رقم (5) والشكل رقم (1).

شكل(1): الكشف عن انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف في بكتريا الزائفة الزنجارية بعد التنمية على وسط مولر هنتون اكار الحاوي على قرصين لمضاد Ceftazidime (30µg) ، المضاف لأحدهما 5 مايكرولتر من مثبط Clavulanic acid على درجة حرارة 37م° لمدة 18-24 ساعة

جدول (5):عزلات الزائفة الزنجارية المنتجة والغير منتجة لانزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESβLs

مصدر العزلة	عدد العزلات الجرثومية المنتجة لانزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESβLs (%)	مصدر العزلة	عدد العزلات الجرثومية غير المنتجة لانزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESβLs (%)
مسحات الحروق ، الجروح ومسحات الاذن وعينات الادرار	11 (55%)	مسحات الحروق ومسحات الاذن وعينات الادرار	9(45%)
***P* value**	**0.655[NS]**		

تتوافق هذه النتائج مع نتائج دراسة Shiny وزملاؤه عام 2016 ، اذ بلغت نسبة عزلات الزائفة الزنجارية المنتجة لانزيمات 59% ESβLs (Shiny *et al.*,2016). قد يعود السبب في الانتشار الكبير لبكتريا الزائفة الزنجارية المنتجة لانزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف الى الاستخدام الكبير والغير ضروري لسيفالوسبورينات الجيل الاول والثاني والثالث في حالات عديدة في المعالجة المختلفة بسبب توفر ورخص ثمن هذه المضادات ، والاستخدام الخاطئ لهذه المضادات من قبل المرضى وبيعها بدون وصفات من قبل الصيادلة ، ادى الى موت العترات الحساسة فاسحة المجال للعترات المقاومة للتكاثر والانتشار خاصة في بيئات المستشفيات . تبين الدراسة الحالية انه كلما ازدادت نسبة العزلات المنتجة لانزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESβLs ازادت قدرة بكتريا الزائفة الزنجارية على مقاومة المضادات الحياتية ، مما يدل على وجود علاقة مابين المقاومة المتعددة وانتاج انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESβLs عند بكتريا الزائفة الزنجارية وكما مبين في جدول رقم (6).

جدول(6): العلاقة بين عزلات الزائفة الزنجارية المنتجة لانزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESβLs والمقاومة المتعددة لمضادات الحياة MDR

عدد العزلات	عدد العزلات المنتجة منها لانزيمات ESβLs	نسبة العزلات المنتجة لانزيمات ESβLs في العزلات متعددة المقاومة %	المقاومة المتعددة MDR
11	**6**	**54.5**	**MDR(3)**
5	**3**	**60**	**MDR(4)**
1	**1**	**100**	**MDR(6)**
1	**1**	**100**	**MDR(7)**
***P* value**	**< 0.001**		

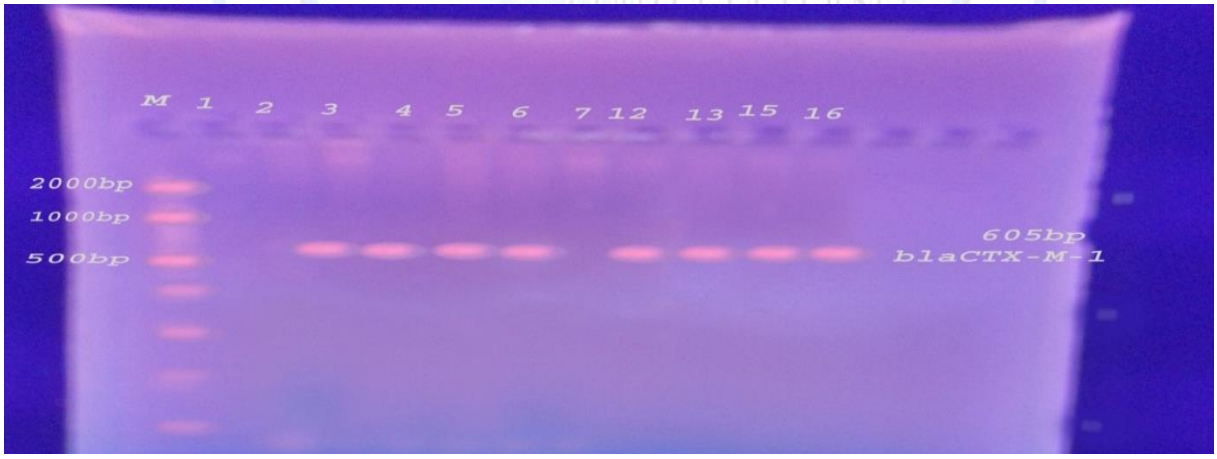
ويمكن تفسير هذه النتائج بأن العناصر الوراثية الانتقالية الموجودة عند بكتريا الزائفة الزنجارية تلعب دوراً كبيراً في نقل العديد من الجينات المسؤولة عن مقاومة هذه البكتريا تجاه عدد من مجاميع المضادات الحياتية وخصوصاً الانتغرونات

Integrons ، اذ تلعب دوراً كبيراً في اكساب بكتريا الزائفة الزنجارية صفة المقاومة المتعددة MDR ، اذ غالباً ما تترافق مع العناصر الوراثية المنقولة كالترانسبوزونات والبلازميدات (Odumosu *et al*.,2013).

5. الكشف عن الجين *bla*$_{CTX-M-1}$ Detection of *bla*$_{CTX-M-1}$ gene

تم الكشف عن الجين *bla* $_{CTX-M-1}$ في 11 عزلة (55%) من العزلات الداخلة في الدراسة، اذ كانت نتائج الكشف ان (8) عزلات كانت حاملة للجين *bla* $_{CTX-M-1}$ وبنسبة 72.7% وبفارق احصائي معنوي (P=0.05) وكما مبين في الشكل رقم (2)، اذ بينت نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل لجين *bla* $_{CTX-M-1}$ انه يمتلك حجم 605 زوج قاعدي عند مقارنة الحزم المتضاعفة مع الدليل الحجمي DNA Ladder . توافقت هذه النتائج مع نتائج دراسة الباحث العراقي Al-kaabi عام 2011 ، اذ كانت نسبة بكتريا الزائفة الزنجارية الحاملة للجين *bla* $_{CTX-M-1}$ 83.33% (Al-kaabi *et al*.,2011).

ان وجود الجين *bla* $_{CTX-M-1}$ في بكتريا الزائفة الزنجارية قد يفسر المقاومة المتعددة لمضادات البيتالاكتام ، اذ ان الجين *bla* $_{CTX-M}$ يشفر لمقاومة مضادات Cefotaxime وCeftazidime وان هذا الجين يشفر ايضا لمقاومة مضادات البنسلينات و المونوباكتام (Canton *et al*.,2012;Moghaddam *et al*.,2014).



شكل (2): الترحيل الكهربائي لجين *bla*$_{CTX-m-1}$ لبكتريا الزائفة الزنجارية بواسطة هلام الاكاروز بتركيز 1% الحاوي على0.5µg/ML من صبغة Ethidium bromide وبأستعمال DNA ladder (100Bp-2000Bp) ، وبفرق جهد 75 فولت لمدة ساعة و 30 دقيقة ، اذ تبين المسارات 3،4،5،6،12،13،15،16 وجود الجين *bla*$_{CTX-m-1}$ ، اما المسارات رقم 1,2,7 فلا تحتوي على الجين .

الاستنتاجات

اظهرت هذه الدراسة عدة إستنتاجات هي إن بكتريا الزائفة الزنجارية من المسببات المهمة لأخماج الحروق والجروح واخماج الاذن والمجاري البولية ، وإن لبكتريا الزائفة الزنجارية القابلية على المقاومة المتعددة MDR لمضادات البيتالاكتام ومدى قابلية بكتريا الزائفة الزنجارية على إنتاج عوامل الضراوة واهمية عوامل الضراوة والجينات المشفرة لأنتاج انزيمات البيتالاكتاميز في المقاومة المتعددة لمضادات الحياة.

المصادر

1. **Abdullah,R.M**.and Mahdi,A.F.(2016).Identification of *Pseudomonas aruginosa* from clinical specimen By using 16S rDNA.Iraq Acad. Sci. J.10(1):45-49.
2. **Al-Kaabi,** M.H.A.(2011). Detection of TEM and extended spectrum β-lactamase enzymes produced By some Gram negative Bacteria using polymerase chain reaction. M. Sc. Thesis. College of Science .Al-Mustansiryah University.
3. **Al-marjani,F.;** Mohammed,R.; Abd,Y. and Mansour,F.(2015).Efflux Pumps In Colistin Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolated in Baghdad. Int. J. Advan. Res.3(11):680-5.
4. **Almeida**, C.; Azevedo, N. F.; Santos, S.; Keevil, C. W. and Vieira, M. J. (2013). Correction: Discriminating Multi-Species Populations in Biofilms with Peptide Nucleic Acid Fluorescence In Situ HyBridization (PNA FISH). PLoS ONE. 8(6): 101-371.
5. **Al-Musawi,** D.K.M.(2014).Correlation of Quorum Sensing Genes with some Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* . M. Sc. Thesis. College of Science.Al-Mustansiryah University.
6. **Ansari,A.;**Salman,M. and Yaqoob,S.(2015).Antimicrobial Resistance Pattern in *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated at Ears Lucknow,India.International J. curr. Microbiol. App. Sci.1:48-58.
7. **AUDA, I. G.;** AL-KAKEI, S. N. H. and HAMED, S. L.(2013). Occurrence of CTX-M-I Type β-lactamases Gene in Certain Gram Negative Bacteria. IPMJ. 12(2): 306-11.

8. **Baron**, E. J. ; Finegold, S. M. and Peterson, I. L. R. (2007) .Bailey and Scotts Diagnostic Microbiology. 9th. ed. Mosby Company. Missouri.
9. **Bredenstein, E.B.M.;** Fuente-Nunez, C. and Hancock, R.E.W.(2011). *Pseudomonas aeruginosa* all roads lead to resistance. Trends Microbiol. 19(8):419-25.
10. **CANTÓN, R.;** GONZÁLEZ-ALBA, J.M.and GALÁN, J. C. (2012). CTX-M enzymes: origin and diffusion. Front Microbiol. 3(110): 1-19.
11. **CLSI.** (2011). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing ; Twenty-First Informational Supplement M100-S21 . Clinical and Laboratory Standards Institute , Wayne, PA. USA . 30(1): 1-115.
12. **CLSI**. (2014) . Performance standards for antimicrobial susceptibility testing twenty-second informational supplement . M100-S24.Clinical Laboratory Standards Institute . 34 (1): 58-172.
13. **Cotar,A.;** Chifiriuc,M.; Dinu ,S. Bucur,M.; Iordache,C.; Banu,O.; Dracea,O.; Larion,C. and Lazar ,V.(2010). Screening of Molecular Virulence Markers in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Clinical Infections.Int. J. Mol. Sci..11: 5273-91.
14. **Davies, J. C.**(2002).*Pseudomonas Aeruginosa* in Cystic Fibrosis: Pathogenesis and Persistence. Paediatric Respiratory Reviews. 3(2):34-128.
15. **Essawi,T.;**Sabri,I. and Farraj,M.(2013).Extended spectrum β-lactamase and antimicrobial susceptibility among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the west Bank,Palastine.J.Microbiol. Infect. dis.3 (2):56-60.
16. **Fadhel,R.A.(**2013).Inhibition of Biofilm production of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from patients with Diabetic Foot Ulcer Grade II . M.Sc.Thesis.College of Science.Al-Mustansiryah University. College of Science University of Baghdad.
17. **GELLATLY, S. L.;** HANCOCK, R. E. W. (2013). *Pseudomonas aeruginosa* new insights into pathogenesis and host defenses. Pathog. Dis. 67(3): 159–173.

18. **Gupta,R.;**Malik,A.;Rizvi,M.and Ahmed,M.(2016).Incidence of Multidrug-Resistant *Pseudomonas Spp*. In ICU Patiens with Special Resistance to ESBLs, AMPC, MBL and Biofilm Production . J. Glob. Infect. Dis.8(1):25-31.
19. **Haenni,M.;**Hocquet,D.;Ponsin.;Cholley,P.;Guyeux,C.;Madec.J.andbertrand,x.(2015). Population structure and antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* from animal infections in France. BMC Veterinary Research**.**11(9):1-5.
20. **HoiBy,N.;** Bjarnsholt,T.; Givskov,M.; Molin,S. and Ciofu,O.(2010). Antibiotic resistance of Bacterial Biofilms. Int. J. Antimicrob. Agents. 35(4): 322–32.
21. **Kadry,K**.(2003).Lack of Efflux Mechanism in a Clinical Isolate of *Pseudomonas aeruginosa* Highly Resistant to Beta-Lactams and Imipenem. Folia Microbiologica .48(4): 529-33.
22. **Lalzampuia,**H.,and Dutta,T.K.(2013).PCR-Based Detection of Extended-Spectrum β-Lactamases(*blaCTX-M-1* and *blaTEM*) in Escherichia *Coli,Salmonella Spp*. And *Klebsiella pneumonia* isolated from Pigs in North Eastern India(Mizoram).Indian J.Microbiol. 53(3): 291–6.
23. **Levesque, R**. (2007) . SPSS Programming and Data Management , 4th. ed . Chicago .522 .
24. **Martins, M. ;** Viveiros, M. ; Couto, I. ; Costa, S. S. ; Pacheco, T. ; Fanning, S. ; Pagès, J. M. and Amaral, L. (2011) . Identification of efflux pump-mediated multidrug-resistant Bacteria By the Ethidium Bromide-agar Cartwheel Method . In Vivo. 25: 171–78.
25. **Moghaddam, M. N.,** Beidokhti, M. H., Jamehdar, S. A., & Ghahraman, M. (2014). Genetic properties of bla_{CTX-M} and bla_{PER} β-lactamase genes in clinical isolates of Enterobacteriaceae By polymerase chain reaction. Iranian j. Basic med. sci.17(5): 378.
26. **MOHAMMAD, H. H.** (2013). Phenotypic Investigation for Virulence factors of Pyocine producing *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Burn Wounds, Iraq. IJ SER .4(7): 2114-21.
27. **MORITA, Y.;** TOMIDA, J.and KAWAMURA, Y. (2012). MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. Front Microbiol. 3(408): 1-13.

28. **ODUMOSU, B. T.;** ADENIYI, B. A. and CHANDRA, R.(2013). Analysis of integrons and associated gene cassettes in clinical isolates of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* from Southwest Nigeria. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 12(29): 1-7.
29. **PARK, A. J.;** SURETTE, M. D.; KHURSIGARA, C. M. (2014). Antimicrobial targets localize to the extra cellular vesicle associated proteome of *Pseudomonas aeruginosa* grown in a Biofilm. Antimicrob. Res. Chemother. 5(464): 1-12.
30. **PATERSON, D. L.** (2006). The Epidemiological Profile of Infections with MultidrugResistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* Species. Infec. Dis. Soci. Ame. 43(2): 43–48.
31. **Pearson, J.P.;** Van Delden, C.and Iglewski, B.H.(1999). Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. J. Bacteriol .181(4):1203-10.
32. **Pincus**, **D. H.** (2011) . Microbial Identification Using The Biomérieux Vitek® 2 System . BioMérieux, Inc. Hazelwood, MO, USA . 1: 1-32.
33. **Rezai, M.S. ;** Salehifar, E. ; Rafiei, A. ; Langaee, T. ; Rafati, M. ; Shafahi, K. and Eslami, G. (2014) . Characterization of multidrug resistant extended-spectrum Beta-lactamase producing *Escherichia coli* among uropathogens of pediatrics in north of iran . Biomed Research International . 23: 4847-61 .
34. **Sambrook,J.** and Russel,D. (2001). Detection of DNA on agarose gel.In: Sambrook J,Russel,D.W.(eds) Molecular cloning , a laboratory manual.Cold Spring Harbor Laboratory,New York, 514-18.
35. **Sanchez,C.J.;**Mende,K.;Beckius,M.L.;Akers,K.S.,andRomano,D.R.(2013).Biofilm formation By clinical isolates and the implications in chronic infections.BMC Infect. Dis.47:1471-34.
36. **SHAIKH, S.;** FATIMA, J.; SHAKIL, S.; RIZVI, S. M. D. and KAMAL, M. A.(2015).Prevalence of multidrug resistant and extended spectrum Betalactamase

producing *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital. Saudi J. Biol. Sci. 22(1): 62-4.

37. **Shiny,P.A.;**Rajendran,S. and Sarayu,L.(2016).Astudy on isolation and antibiotic sensitivity testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with respiratory tract infection with special reference to phenotypic and genotypic characterization of extended spectrum Beta lactamases(ESBLs).j. med.microbiol.80-6.
38. **STRATEVA, T.;** YORDANOV, D. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* a phenomenon of Bacterial resistance. J. Med. Microbiol. 58, 1133–1148.
39. **Suresh,M.;**Nithya,N.;Jayasree,PR.andManish,K.PR.(2016).Detection and prevalence of efflux pump-mediated drug resistance in clinical isolates of multidrug-resistant gram-negative Bacteria from north Kerala,India.Asian J. Pharma. Clin.Res.9(3):324-7.
40. **Tang,J.;** Kang, M.; Chen, H.; Shi, X.; Zhou, R.;Chen, J. and Du, Y.(2011). The Staphylococcal nucclease prevents Biofilm formation in *Staphylococcus aureus* and other Biofilm-forming Bacteria.Sci. China. Life. 54(9):863-9.
41. **Tavajjohi, Z.** Moniri, R. and Khorshidi, A. (2011). Detection and characterization of multidrug resistance and extended-spectrum-Beta-lactamasae-producing(ESBLs) *Pseudomonas aeruginosa* isolates in teaching hospital.Afri.J.MicroBiol.Res.5(20):23-28.
42. **Ullah, F.,** Malik, S.A. and Ahmed, J. (2009). Antimicrobial susceptibility and ESBL prevalence in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in the north west of Pakistan. Burns 35(7): 1020-25.

المصادر العربية

1. **الصفار** ، بتول عبد الأمير باقر . (2010) . 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 .