مجلة القادسية للعلوم الصرفة المجلد 17 العدد 2 سنة 2012
ازهار نوري / لمى فؤاد منحر ISSN-1997-2490

دراسة المحتوى البلازميدي لبكتريا *Pseudomonas aeuroginosa* وعلاقته بالمقاومة للمضادات الحياتية

أزهار نوري حسين الموسوي لمى فؤاد منحر

كلية التربية /قسم علوم الحياة

الخلاصه -:

جمعت (200) عينة سريرية من أخماج الحروق والجروح والأذن والأنف والقناة التنفسية العليا من المرضى المراجعين والراقدين في مستشفى الديوانية التعليمي ومستشفى النسائية والأطفال التعليمي في محافظة الديوانية للمدة من تشرين الأول 2010 م الى أذار 2011 م . بلغ عدد العينات التي أعطت نتيجة موجبة للنمو البكتيري(150) عينة أي بنسبة (75%) وبالأعتماد على الصفات الزرعية والمجهرية والأختبارات الكيموحيوية والتأكيدية المتمثلة بنظام Vitek لغرض التشخيص الدقيق شخصت (30) عزلة بكتيرية (20%) تعود لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* وأختبرت حساسية هذه البكتريا لعشرة مضادات حياتية فأظهرت البكتريا مقاومة عالية لتسعة من المضادات المختبرة في حين أبدت حساسية بلغت (46.66%) لمضاد Ciprofloxacin أنتخبت (15) عزلة من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* لدراسة النسق البلازميدي أعتمادا على مقاومتها للمضادات الحياتية ، فأظهرت النتائج أحتواء (10) عزلات على حزم بلازميدية صغيرة وأخرى كبيرة وأن هذه العزلات أبدت مقاومة متعددة للمضادات الحياتية ، في حين هناك (5) عزلات لم تحوي على حزم بلازميدية وأبدت مقاومة متعددة للمضادات .

المقدمة -:

تعد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من الممرضات الانتهازية الثانوية Secondary opportunistic pathogen المهمة التي تتميز بقدرتها على احداث انواع مختلفة من الاصابات في مواقع متعددة من الجسم منها التليف الكيسي Cystic Fibrosis، اخماج القناة البولية (UTI) Urinary tract infections ، تجرثم الدم Bacteremia ، اخماج العين Eye infections ، اخماج الاذن Ear infections ، اخماج الجلد Skin infections ، أخماج الجهاز العصبي المركزي Central nervous system infections ، التهاب شغاف القلب Endocarditis ، اخماج العظم والمفصل Bone and joint infections (37) . تزداد نسبة الاصابة بهذه البكتريا في حالات نقص المناعة و الأورام السرطانية وبعد عمليات نقل الاعضاء وفي حالات الإصابة المختلطة (36) إذ ترتبط امراضيتها بقدرتها على إنتاج العديد من عوامل الضراوة ، والتي تشمل على العوامل الخارج خلوية Extra cellular متمثلة بقدرتها على غزو انسجة المضيف ، وتعتمد في ذلك على انتاج انزيمات خارج خلوية وسموم تعمل على تعطيل الحواجز الفيزياوية وتحطيم خلايا المضيف Host cells ، فضلا عن مقاومة عملية البلعمة Phagocytosis والدفاعات المناعية للمضيف ، ومن الانزيمات التي تنتجها هذه البكتريا هي Protease و Hemolysin ، اذ تنتج نوعين من انزيمات البروتيز هما Elastinase , Alkaline Protease ، واللذان يعملان على تحليل elastin و Fibrin على التوالي واللذان يبطنان الاوعية الدموية لخلايا المضيف . كما تنتج هذه البكتريا ثلاث انواع من البروتينات الذائبة Soluble proteins ، اذ تشترك هذه البروتينات في عملية الغزو Invasion للنسيج وهي Cytotoxin او مايعرف بـ Leukocidin وذلك بتاثيرها على خلايا الدم العدلة Neutrophils ونوعين من الانزيمات الحالة Hemolysins هما Lecithinase و Phospholipase (11) .

تعد بكتريا *P.aeruginosa* المضيف الطبيعي لعدد كبير من البلازميدات مثل بلازميدات المقاومة للمضادات الحيوية المختلفة وبلازميدات العناصر الثقيلة مثل الزئبق والكروم واليورانيوم وبلازميدات المقاومة للاشعة فوق البنفسجية وبلازميدات أنتاج البكتيوسين (24) . فضلا عن بلازميدات مشفرة لعدد من الانزيمات مثل أنزيمات البيتالاكتاميز. إذ اشارت العديد من الدراسات إن

أغلب عزلات هذه البكتريا تمتلك الجينات المشـفرة لانزيمات البيتالاكتاميز ، وان هذه الجينات يمكن لها أن تنتقل الى أنواع أخرى من البكتريا السالبة لصبغة كرام (30)

هدف الدراسة Aim of The Study :

- تحديد النسـق البلازميدي لبكتريا إل. *P.aeruginosa* ذات العلاقة بالمقاومة للمضـادات الحياتية والمعزولة من اخماج سـريرية مختلفة باستخدام تقنية الغليان لعزل الدنا البلازميدي والترحيل الكهربائي ولتحقيق هذا الهدف اجريت الخطوات الاتية :

طرائق العمل -:

-1جمع العينات Collection of Samples

جمعت 200عينه من نماذج جروح ، حروق ، الإذن ، الأنف و القشع من المرضى الوافيدين والراقدين في مستشفى الديوانية التعليمي ومستشفى النسائية والاطفال التعليمي في محافظة الديوانية للفترة من تشرين الاول 2010م الى اذار 2011م .

-2زرع النماذج المرضية وتشخيص البكتريا -:

زرعت النماذج المرضية على وسط اكار الدم واكار الماكونكي والمحضرحسب تعليمات الشركة المصنعةIndia/Himedi . حضنت الإطباق في الحاضنة بدرجة)37 (م °لمدة)24 (ساعة .بعدها تم تشخيص العزلات البكتيرية بالاعتماد على الصفات الزرعية والفحص المجهري والفحوصات الكيموحيوية على وفق ما جاء في (9)

-3التشخيص بنظام Vitek

يعد نظام الـ Vitek من الانظمة التشخيصية الحديثة و السريعة في التشخيص البكتيري ويعطي نتائج دقيقة تصل دقتها الى 99) (%، ولغرض التأكد بأن العزلات المدروسة تعود الى بكتريا *P. aeruginosa* فقد استخدم النظام اعلاه وحسب تعليمات الشركة المجهزة لغرض تشخيص بكتريا *P.aeruginosa* على وفق ماجاء في (38 , 39)

– 1زرعت العزلات البكتيرية على وسط اكار الماكونكي MacConkey agar وحضنت بدرجة حرارة (37)م °لمدة (24) ساعه .

– 2حضر عالق بكتيري من المزروع البكتيري وذلك بنقل مستعمرة واحدة من كل طبق الى أنابيب إختبار حاوية على (3)ملليتر من المحلول الملحي الفسيولوجي بتركيز (% 85)ثم خففت عكورة النمو الى أن نحصل على عالق كثافته تتراوح بين (0.63- 0.5) والذي يكافئ 1.5 x 10^8 خلية/مل وذلك باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer بطول موجي (230) نانوميتر .

–3وضعت الانانبيب أعلاه في جهاز الـ Vitek الذي يقوم بقراءة النتائج تلقائيا وتحديد نوع البكتيريا الموجودة في العالق.

-3اختبار حساسية بكتيريا *P. aeruginosa* للمضادات الحيويه

اختبرت حساسيه عزلات بكتيريا *P.aeruginosa* المشخصه لـ (10) أنواع من المضادات الحيويه التي تم الحصول عليها بشكل اقراص جاهزة مجهزة من مركز الرازي /العراق باستخدام وسط اكار مولر هنتون باعتماد طريقة Bauer و Kirby وكما في (15) وكالاتي -:

- 1زرعت العزلات البكتيرية على وسط الاكار المغذي Nutrient agar المجهز من شركة India / Himedia ووضعت في الحاضنة بدرجة (37)مْ لمدة (24-18)ساعة .

-2نقلت ((4-5مستعمرات من البكتريا النامية في الاطباق اعلاه وزرعت في انابيب حاوية على (5)ملليتر من وسط Tryptone Soya broth المجهز من شركة Himedia / India وحضنت بدرجة (37)مْ لمدة (2-8)ساعات الى ان يمكن ملاحظة عكورة النمو بالعين المجردة.

-3خفف النمو الحاصل في الفقرة اعلاه الى ان تم الحصول على عالق بكتيري ذي عكورة مقاربة لعكورة محلول ثابت العكوره القياسي الجاهز (Macfarland standard tube o.5) والذي يعطي عددا تقريبا للخلايـــا10^8 × .0.5 خليه /ملليتر .

4 – نشر (0.1)ملليتر من المزروع اعلاه على وسط اگار مولر هنتون بواسطة الناشر المعقم Spreader ، تركت الاطباق لتجف بدرجة حراره الغرفه لمدة (15-10)دقيقه

- 5نقلت اقراص المضادات بواسطة ملقط معقم الى الاطباق وبواقع (5)اقراص للطبق الواحد ، حضنت الاطباق بدرجة حراره (37م °لمدة (24)ساعه .

6 -قرئت النتائج بملاحظة مناطق التثبيط المتكونة حول أقراص المضادات الحياتية وفسرت النتائج مع ماورد في .(13)

-4عزل الدنا البلازميدي Plasmid Isolation

استعملت طريقة الغليان (Boiling method)وحسب ماجاء في (32)،وحضرت المحاليل الخاصة بهذه الطريقة وفقا لما جاء في (32).

1-لقح (5)ملليتر من وسط المرق المغذي Nutrient broth المضاف له مضاد Amoxicillin بتركيز (100)مايكروغرام / ملليتر من عالق البكتيريا بعمر (24)ساعه .

2 -حضنت المزارع في حاضنه هزازه بدرجه حراره 37م°لمدة 24ساعة .

3 -نقل (1.5)ملليتر من العالق الى انابيب ابندروف (Eppendrof tube) المعقمه والمجهزة من شركة من LKB (Sweden) بعدها رسبت الخلايا البكتيريه بجهاز المنبذه بسرعة 5000دوره /دقيقه لمده (5)دقائق .

4 -اهمل الراشح وعلقت الحبيبه (Pellet)المتكونه بمقدار (350)مايكرولتير من دارئ STET و (25)مايكرولتير من محلول انزيم الايسوزايم المحضر انيا بتركيز /10ملغم /ملليتر رج المزيج بالمازج (Vortex)بشكل جيد لمدة (3)ثواني وترك لمدة (10)دقائق في ثلج مجروش .

5 -نقلت الانابيب الى حمام مائي بدرجة حراره (100)م °لمدة (40) ثانيه ثم رسبت بجهاز المنبذه الدقيقه بسرعة (13000)دورة /دقيقه لمدة (10)دقائق .

6 -سحبت الحبيبه اللزجه المتكونه بواسطة عيدان خشبيه نظيفة .

7 -اضيف الى الرائق (40)مايكرولتر من (2.5)مولار خلات الصوديوم و (420)مايكرولتر من كحول ايزوبروبيل خلطت المقادير برجها بهدوء ثم حفضت النماذج بدرجة حراره 4م °لمدة 24ساعة او بدرجة (20-)لمدة ساعتين .

8 -نبذ المزيج بواسطة المنبذة الدقيقة بسرعة (13000)دورة/دقيقة لمدة (15)دقيقة .أهمل الراشح وترك الكحول ليتبخر بدرجة حرارة الغرفة .

9 -اضيف (25)مايكروليتر من دارئ (TE) ذو pH =8 لاذابة الدنا البلازميدي المترسب على جدران الانبوبة .وقد اصبحت جاهزة للترحيل الكهربائي .

-5الترحيل الكهربائي للدنا البلازميدي Gel electrophoresis

اجري الترحيل الكهربائي للدنا البلازميدي على هلام الاكاروز وفقـــا لما جـــــاء في (33)وكالاتي -:

1 -حضر هلام الاگاروز باذابة 0.7غم من الاگاروز في 100ملليترمن دارئ TBE ذو pH =8 للحصول على تركيز (0.7%) وسخن الى درجة الغليان ثم ترك ليبرد بدرجـــة حرارة (50- 45)م °واضيف اليه (10)مايكرولتر من صبغة بروميد الاثيديوم وبتركيـــــز (0.5)مايكروغرام /ملليتر .

2 -حضرت صفيحة اسناد الاگاروز Tray باحاطة حافتها بشريط لاصق لمنع تسرب الهلام الذائب بعد صبه ثم ثبت في احد طرفي الصفيحه مشط تكوين الحفر Comb لعمل الحفر فيها Wells والمعده لتحميل العينات .صب الهلام الاگاروز بهدوء في الصفيحه لمنع حدوث فقاعات هوائيه وترك لمدة 30دقيقه ليتصلب بعدها رفع المشط والشريط الاصق بهدوء من الاگاروز المتصلب وثبتت الصفيحه على مسندها في وحدة الترحيل الكهربائي الافقيه وملئ الحوض بدارئ TBE بحيث يغطي سطح الهلام.

3 -حضر الدنا البلازميدي بنقل (10)مايكروليتر من العينه المحضره في الفقره ( ) 4 الى انبوب ابندروف واضيف اليه (5)مايكروليتر من دارئ التحميل Loding buffer ذو pH =8 ، مزج بهدوء ، ثم حمل في الحفر المخصصه له ، بعدها مرر تيار كهرباء بفرق (05)فولت /60 ملي امبير لمدة ساعتين ولحين وصول الصبغه الدالة على الجهة البعيدة من الاگار .

4 -فحص الهلام باستعمال مصدر للاشعه فوق البنفسجيه Uv-Transilluminator المجهز من شركة UVP (U.S.A)عند طول موجي (340)نانومتر وصور بأستخدام كاميرا رقمية .

النتائج والمناقشة

.1العزل والتشخيص

تم الحصول على (150)عينه أعطيت نتيجه موجبه للنمو البكتيري وبنسبة (75%)وتتوافق نتائج دراستنا مع ماتوصل اليه 8)) الذي أشار الى ان نسبة العزل الأولي للبكتريا من حالات سريريه مختلفه كانت (76.2%)، في حين أشار (18) الى أن نسبة العزل البكتيري كانت (51%)وقد يعود سبب عدم اعطاء (50)عينه أي (25%)نتيجه موجبه للنمو البكتيري الى كون المريض قد تناول علاجا مسبقا أو أن المسبب المرضي هو فايروسي أو فطري ولم تتوافر له الظروف المختبريه المناسبه للنمو (21) ، وأظهرت نتائج الدراسه الحاليه أن أعلى نسبة عزل للبكتريا كانت من التهابات الحروق (95%)تليها التهابات الجروح (82.5%)ومن ثم القشع (72.5%)و (67.5%)من الأنف وأقلها (57.5%)مـــن الأذن)جدول . (1تتوافق نتائج دراستنا هذه مع ماتوصـــل اليـــه 5)) اللذين أشاروا الى ان نسبة عزل البكتريا كانت (84%)، في حين أشار((25 الى أن أعلى نسبة عزل بكتيري كانت من الجهاز التنفسي أذ بلغت . (65%)ولا تتفق نتائج دراستنا هذه مع ما أشارت اليه (2)، و التي ذكرت بأن نسبة عزل هذه البكتريا كانت (% 32.2)،.من اخماج الاذن .

جدول (1) اعداد العينات المزروعة ونسب النمو البكتيري في مواقع الاصابة المختلفة

موقع الاصابة	عدد العينات	عدد العينات التي أعطيت نتيجه موجبه للنمو البكتيري	النسبه (%)
الجروح	40	33	82.5
الحروق	40	38	95
الأذن	40	23	57.5
الأنف	40	27	67.5
القشع	40	29	72.5
المجموع الكلي	200	150	75

يبين الجدول (2)أن أعلى نسبة عزل لبكتريا *P.aeruginosa* هي (34%)كانت من التهابات الحروق ومن ثم الجروح بنسبة (20%)وأقلها نسبه كانت (6.6%) من الأنف علما أن العدد الكلي للعزلات البكتيريه والتي تعود الى أجناس بكتيرية مختلفة كان (166)عزله .تتوافق نتائج دراستنا هذه مع ماتوصل اليه 16)) ، الذين أشاروا الى أن أعلى نسبة عزل (29%)لهذه البكتريا كانت من التهابات الحروق والجروح ، وقد يعود شيوع بكتريا *P. aeruginosa* في حالات الحروق الى مقاومة هذه البكتريا للمضادات الحياتيه والمطهرات المستعملة في المعالجة. (*7*)

جدول (2) اعداد ونسب عزلات بكتريا *P. aeruginosa* المعزولة من مواقع الأصابة المختلفة

موقع الأصابه	عدد العزلات البكتيريه	عدد عزلات بكتريا *P. aeruginosa*	النسبه (%)
الجروح	35	7	20
الحروق	44	15	34
الأذن	25	3	12
الأنف	30	2	6.6
القشع	32	3	12
الكلي	166	30	180

.2مقاومة بكتريا *P. aeruginosa* للمضادات الحيوية

أظهرت النتائج المبينة في الجدول (3)أن هنالك تباينا واضحا في تأثير المضادات المدروسة على بكتريا *P. aeruginosa* ، فقد تبين أن مضاد Ciprofloxacin هو أفضل المضادات الحياتية من حيث التأثير على بكتريا *P. aeruginosa* ، أذ أبدت البكتريا أقل نسبة مقاومة له (46.66%)وأستجابت له بنسبة . (53.33%)تتفق هذه النتيجة مع ماتوصل اليه 28)) الذين توصلوا الى نسبة مقاومة مقاربة بلغت (44.8%)وبينوا أن مضاد Ciprofloxacin الذي يعود الى مضادات الكوينولونات المستخدمه في علاج الاخماج الناتجه عن الأصابه ببكتريا *P. aeruginosa* فيما يرى (1) في دراسة أن نسبة مقاومة بكتريا *P. aeruginosa* لمضاد Ciprofloxacin هي (5%)فقط ، أما (4) فتوصلت في دراستها الى أن عزلات بكتريا *P. aeruginosa* لم تقاوم مضاد Ciprofloxacin مطلقا أذ كانت نسبة أستجابتها له (100%)كذلك توصل (6) الى أن عزلات بكتريا *P. aeruginosa* المعزوله

من أخماج سريريه مختلفه قد قاومت مضاد Ciprofloxacin بنسبة (58%)، وقد يعود سبب الأختلاف في نتائج دراستنا مع هذه الدراسات الى الظروف المختبرية المستخدمة اثناء أجراء التجربة أو الى مصدر العزلات البكتيرية المعزولة أذ أن أغلب العزلات البكتيرية المعزولة من الخماج السريرية أو من المستشفيات تكون ذات مقاومة متعدده للمضادات الحياتية نتيجه للأستخدام المفرط للمضادات الحياتية مما يحث مقاومة البكتريا للمضادات من جهه ومن جهة أخرى فأنها قد تكتسب بلازميدات تحمل جينات عديدة تشفر للأنزيمات المسؤولة عن المقاومة وأن كثرة أستخدام المضادات الحيوية ينتخب هذه البكتريا المقاومة (35,34) جاء مضاد Tobramycin وهو من مجموعة الأمينوكلايكوسيدات بالمرتبه الثانية من حيث تأثيره على البكتريا أذ بلغت نسبة المقاومه له (70%)وأستجابت له البكتريا بنسبة (30%)مقارنة بمضاد Gentamycin والذي يعود لنفس المجموعه أعلاه أذ قاومته البكتريا بنسبة (86.66%)وأستجابت له بنسبة . (13.33 %)ذكـــــر 17)) بأن (62%)من البكتريا السالبه لصبغة گرام تبدي مقاومة لمضادات الأمينوكلايكوسيدات وتزداد هذه النسبة لتصل الى (84%)بالنسبة للعزلات البكتيرية التي عزلت من مصادر سريرية نتيجة للأستخدام المتزايد لهذه المضادات في المستشفيات .أن المقاومة لمضادات الأمينوكلايكوسيدات أخذت بالتزايد بشكل ملحوظ في السنوات الأخيره ، وقد يعود سبب هذه المقاومة الى أنتاج أنزيمات من قبل البكتريا المقاومة وهذه الأنزيمات تقوم بتحوير المضاد وبالتالي يفقد فعاليتة أو تأتي كنتيجة لفقدان بعض بروتينات الغشاء الخارجي مما يقلل من نفاذية المضاد الى داخل الخلية . (29)

وفيما يخص مضادي Tetracyclin وChloramphenicol فقد بلغت نسبة مقاومة العزلات المدروسة لهما (90%)و (96.66%) على التوالي ومضاد Erythromycin وهو من مجموعة Macrolides الذي قاومته البكتريا بنسبة . (96.66%)جدول (3).

أن المقاومة لهذه المضادات قد تشفر لها جينات محموله على الكروموسوم ، وقد يعود سبب مقاومة البكتريا لها الى أمتلاك البكتريا الى عدة اليات للمقاومه منها أن مادة Glycocalyx التي تحيط بالبكتريا هي متعدد سكريات ذات شحنات سالبه متعدده وبذلك فأنها قد تشكل حاجزا يمنع أنتشار المضاد الحيوي ومن ثم وصوله الى الموقع الهدف .أو أن هذه البكتريا تكون ناميه على شكل تجمعات Aggregates تكون فيها البكتريا مطموره عميقا وهنا تنمو البكتريا ببطئ نتيجة نفاذ المغذيات العضويه والأيونات غير العضويه والأوكسجين وأن مثل هذا النمو البكتيري البطيئ يكون أقل حساسيه للمضادات الحياتية . (20)

وفيما يخص مضادات السيفالوسبورينات وهي من مجموعة مضادات البيتالاكتام والتي شملت مضاد Cefoxitin وهو من سيفالوسبورينات الجيل الثاني فقد قاومتها البكتريا بنسبة (96.66%)ومضاد Ceftriaxone وهو من سيفالوسبورينات الجيل الثالث أذ بلغت نسبة المقاومة له . (86.66%)جدول (3).

تتفق نتائج دراستنا هذه مع ماتوصل اليه 17)) ، الذي أشار الى نسبة مقاومة بكتريا *P. aeruginosa* لمضادي Cefoxitin و Ceftriaxone هي (94%)و (88%)على التوالي

أما البنسلينات فتم أختيار مضاد واحد منها وهو Amoxicillin فقد قاومته البكتريا بنسبة (96.66%)، و قد يعزى السبب في المقاومه الى كثرة الأستعمال العشوائي للمضادات الحياتيه أذ ذكر 23))الى زيادة نسب البكتريا المقاومه للمضادات الحياتيه وخاصة مضادات البيتالاكتام وعزى السبب الى أستعمال جرع تحت علاجية مما يؤدي الى شيوع العزلات الطافره تلقائيا وأن أغلب سلالات البكتريا السالبة لصبغة گرام أصبح لها القدره على أنتاج أنواع متعددة من أنزيمات البيتالاكتاميز الكروموسومية منها المحللة للسيفالوسبورينات (12) أو المشفر بلازميديا بأختلاف أنواعها فضلا عن أنزيمات البيتالاكتاميز IMP, VIM الموجوده على الأنتكرون Integron التي تعمل على تحليل مضادات البيتالاكتام . (31)

كذلك يتضح من نتائج دراسة حساسية البكتريا للمضادات الحياتية أنها أبدت صفة المقاومه المتعدده للمضادات الحياتية وقد أصبحت مشكلة المقاومة المتعددة التي تبديها البكتريا تجاه المضادات الحياتية من المشاكل الصحية الجديره بالأهتمام لما تسببه من فشل في العلاجات المستعملة في الاصابات المختلفة.

جدول (3) حساسية بكتريا *P. aeruginosa* للمضادات الحيوية .

اسم المضاد	الرمز	العدد والنسبة المئوية للعزلات الحساسه(%)	العدد والنسبه المئويه للعزلات المقاومه(%)
Tobramycin	TB	9 (30)	21 (70)
Co-Trimoxazole	COT	1 (3.34)	29 (96.66)
Gentamycin	GEN	4 (13.33)	26 (86.67)
Tetracycline	T	3 (10)	27 (90)
Cefoxitin	CN	1 (3.34)	29 (96.66)
Ciprofloxacin	CIP	16 (53.33)	14 (46.67)
Erythromycin	E	1 (3.34)	29 (96.66)
Chloramphenicol	C	1 (3.33)	29 (96.67)
Ceftriaxone	CTR	4 (13.34)	26 (86.66)
Amoxicillin	AX	1 (33.34)	29 (96.66)

.3عزل البلازميدات

تم التحري عن المحتوى البلازميدي لـ (15) عزلة من بكتريا *P. aeruginosa* للتعرف على الدور الذي تلعبه البلازميدات في المقاومة للمضادات الحياتية وذلك بأستعمال تقنية الغليان Boiling method ، وبعد ترحيل الدنا اللازميدي على هلام الأكاروز ، أظهرت نتائج النسق البلازميدي لعزلات *P. aeruginosa* أحتواء (10)عزلات على واحد أو أكثر من البلازميدات المختلفة الحجم ووجد أن بعض العزلات أحتوت على بلازميدات متقاربه في الحجم مما يؤكد مدى التقارب بين هذه العزلات وكأن هذه العزلات تعود الى سلاله واحده كما يعطي مؤشرا لأنتشار هذه البكتريا)صوره (1

تبين النتائج الموضحة في الجدول (4)أحتواء (3)عزلات من مجموع (15)عزلة على أكثر من حزمة بلازميدية واحده وتتفق نتائج دراستنا هذه مع ماتوصل اليه (1) و 26)) ، الذين وجدوا أن معظم عزلات بكتريا *P. aeruginosa*تحتوي على أكثر من حزمة بلازميدية واحده علما أن هذه العزلات أبدت مقاومة متعدده للمضادات الحياتية المستخدمة في حين أن هناك (5)عزلات لم تحوي على أي حزمة بلازميدية مع أنها أظهرت مقاومة لأكثر من مضاد حياتي وقد يكون السبب في المقاومة الى أن هذه الصفة محمولة على الكروموسوم . (27)

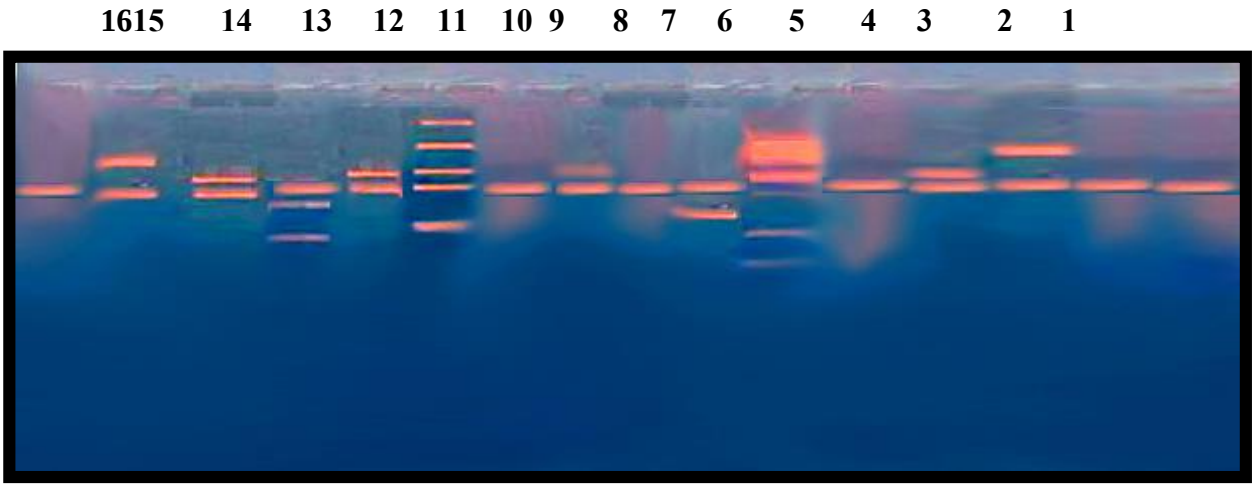
كذلك أظهرت النتائج أحتواء (8)عزلات متمثله بP3) وP4 وP5 و P13 و P16 وP25, P21و (P29,P27, على حزم بلازميديه كبيرة الحجم)صوره(1 وأشـــار 19))الى أن هذه البلازميدات تكون من البلازميدات الأقترانية وهي مسؤولة عن صفة المقاومة المشتركة ، فضلا عن أنها تنتقل بين العزلات البكتيرية مسببة شيوع ظاهرة المقاومة لأغلب المضادات الحياتية .

كما ذكر 6)) ، بأن جينات المقاومة لمضادات البيتالاكتام وغيرها من المضادات الحياتية ممكن أن يتوسطها كروموسوم أو Transposones في عزلات بكتريا *P. aeruginosa* وهي متواجده في البكتريا الخالية من البلازميدات

جدول (4)المحتوى البلازميدي لبعض عزلات بكتريا *P. aeruginosa* قيد الدراسة

ت	رقم العزلة	الحزم الصغيرة	الحزم الكبيرة	المجموع
1	P1	0	0	0
2	P3	0	1	1
3	P4	0	1	1
4	P5	2	0	2
5	P13	0	1	1
6	P16	1	3	4
7	P20	0	0	0
8	P21	0	1	1
9	P23	0	0	0
10	P24	1	0	1
11	P25	2	2	4
12	P26	0	0	0
13	P27	0	1	1
14	P29	0	1	1
15	P30	0	0	0

كذلك فأن ماتوصلنا اليه في نتائج دراستنا هو عدم وجود ترابط بين عدد الحزم البلازميديه وعدد المضادات التي قاومتها العزلات البكتيرية ، فمثلا نلاحظ أن عدد الحزم البلازميدية في العزلتين P16) و (P25هو (4)حزم بلازميدية في حين أنهما قاومتا جميع المضادات الحياتية المستخدمة في الدراسة ، كذلك نلاحظ أن العزلات P1)وP20 و P23 وP26 و (P30قاومت عددا من المضادات بلغ (8, 8,8,8,6)لكل منهما على التوالي في حين أنها كانت خالية من الحزم البلازميدية تماما مما يدل على أن هذه العزلات قد تكون حاملة للجينات المشفره لمقاومة المضادات الحياتية على الكروموسوم أو على الترانزبوزونات وتتفق نتائج دراستنا مع ماتوصلت اليه (3) التي أشارت الى عدم وجود علاقة بين عدد الحزم البلازميدية والمقاومة للمضادات الحياتية .



صورة (1)الترحيل الكهربائي لبلازميدات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*

عمود (1)المحتوى البلازميدي للعزلة P1

عمود (2)المحتوى البلازميدي للعزلة P3

عمود (3)المحتوى البلازميدي للعزلة P4

عمود (4)المحتوى البلازميدي للعزلة P5

عمود (5)المحتوى البلازميدي للعزلة P13

عمود (6)المحتوى البلازميدي للعزلة P16

عمود (7)المحتوى البلازميدي للعزلة P20

عمود (8)المحتوى البلازميدي للعزله P21

عمود (9)المحتوى البلازميدي للعزلة P23

عمود (10)المحتوى البلازميدي للعزلة P24

عمود (11)المحتوى البلازميدي للعزلة P25

عمود (12)المحتوى البلازميدي للعزلة P26

عمود (13)المحتوى البلازميدي للعزلة P27

عمود (14)المحتوى البلازميدي للعزلة P29

عمود (15)المحتوى البلازميدي للعزلة P30

عمود (16)المحتوى البلازميدي لبكتريا *E.coli* MM294

كذلك تم التوصل في هذه الدراسة الى أن بعض العزلات المدروسة أحتوت على حزم بلازميدية متماثلة ومنها العزلات (P21, P13, P4) التي أحتوت كل منها على حزمة بلازميدية كبيرة وكانت الحزم البلازميدية الموجودة في العزلات (P3, P5، P27، P29) وكذلك في العزلتين (P3 وP29)متقاربة في أحجامها لهجرتها المتشابهة في هلام الأكاروز وربما تكون هذه الحزم (P13، P21 هي أشكال متحوره أو مختلفه لبلازميد واحد وظهرت هذه الأشكال نتيجه لتعرض البلازميد الى عدة عوامل أثناء تحضيرة وهذا يجعل تلك الأشكال المختلفة يأخذ كل واحد منها موقعة أثناء الترحيل الكهربائي أو ربما تكون عباره عن بلازميدات متماثلة ، وهنا يشير مثل هذا التماثل في البلازميدات الى وجود تقارب بين هذه العزلات وهذا يعطي مؤشـــرا بيئيا واضحا حول أنتشار البكتـــريا في المجتمــع الصحـــي .(22)

فقد أشار (10) الى أن بكتريا *P. aeruginosa* تحتوي على عدة حزم بلازميدية بلغ حجمها 32Kb و 40Kb و 100Kb ، وهذه الحــزم البلازميدية مسؤولـــة عــن المقاومـــة لــبعض مضادات البيتالاكتـــام ، أمـــا 14)) فقد توصل في دراستة أن عزلات *P. aeruginosa* في دراسته تحتوي على حزمتين بلازميديتين حجمها 100Kb .

أن تقنية النسق البلازميدي تعد واحده من التقنيات الجزيئية المستخدمة في علم الوبائيات الجزيئي التي من خلالها يتم معرفة مدى التقارب بين العزلات المعزولة من حيث المنشأ أو مصدر العدوى وكذلك من خلال هذه التقنية يمكن معرفة مدى أنتشارها في البيئات المختلفة ، وقد أكدت نتائج هذه الدراسة أن هناك بلازميدات مشتركة في بعض العزلات مما يدل على أنتشار هذه البلازميدات بين بعض العزلات قيد الدراسة ومع ذلك فأن هذه التقنية لم تعد كافية ما لم تدعم بتقنيات أخرى مثل بصمة البلازميد والتهجين التي تثبت أن البلازميدات ذات النسق الواحد متماثله من حيث الحجم الجزئي وعدد النيوكليوتيدات وكذلك نوع الجينات الموجودة فيها . (5)

المصادر-:

1. الجشاعه ، فضل أحمد سعيد (2001) . دراسة علاقة مقاومة عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* للمضادات الحيوية مع أنتاجها للبايوسين . رسالة ماجستير . كلية العلوم . الجامعة المستنصرية .
2. أســماعيل ، جميله راضـــي ; المحنه ، بلســم ميري ومهدي ، ســجى (2009) . دراســة بكتريولوجية لجرثومة الزوائف الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من بعض الحالات المرضية في مستشفى الديوانية التعليمي ومستشفى النسائية والأطفال وأختبار الحساسية لبعض المضادات الحياتية . المجلة البيطرية العراقية . المجلة 33 . العدد 2 . 32-35 .
3. الخالدي ، بهيجه عبيس حمود . (2002) . دراسة حول البكتريا الهوائية المسببة لعدوى المستشفيات ومقاومتها للمضادات الحياتية والمطهرات . رسالة ماجستير . كلية التربية . جامعة القادسية .
4. المشهداني ، كوكب أدريس محمود (2004) . دراسة تشخيصية وأمراضية لجرثومة *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من مصادر مختلفة في مدينة الموصل . كلية العلوم . جامعة الموصل
5. Akanji , B.O.; Ajele , J.O.; Oyelakin , O. (2011) . Genetic Finger printing of *Pseudomonas aeruginosa* in volved in Nosocomial in fection as Revealed by RAPD-PCR Markers . Asian Net Work for Scientific information . Central biotechnology Laboratory , II TA. PMB. Ibadan, Nigeria.
6. Albert, M. (2008). B-lactamases resistance in gram negative bacteria : New Challenges for New Drugs. Clin. Infec. Dis., 14:1089-1099 .
7. Al-Shalchi , S.A. ; Jubrael , J.M. and Krekor , A. (2001) . The use of RAPD-PCR atyping method for epidemiological inrestigation of *Pseudomonas aeruginosa* . The second conferencein Medical and Biological sciences , 157-158 .
8. Avains , A.B. (2009). Identification of unusal pathogenic gram-negative aerobic and an aerobic . Afr. J. Med . Sci.24:135-139 .
9. Brooks, G.F.; Butel, J.S.; and Morse, S.A. (2001). "Medical Microbiology". Jawetz, Melnick and Adelbergs. 22nd ed., McGraw-Hill Companies, Appleton and Lange, California, pp. 229-234.
10. Carlos , C. and Jaime , C. (1992) . Plasmid – determined resistance to arsenic and antimony in *Pseudomonas aeruginosa* , Vo. 161.N (4):33-37 .
11. Carter, G.R.; and Wise , D.J. (2004) . *Pseudomonas* and *Moraxella* In : Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology 6th (ed) Ablackwell Publishing Company P.125-128 .
12. Collee, J. G. ; Fraser, A. G. ; Marmion, B. P. and Simmons, A. (1996) Mackie and McCartney Practical medical microbiology, 14th ed. Longman Singapore publishers Ltd. , Singapore .
13. CLSI, (2010) . Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Vol. 30 No. 1 .

14. El-Naggar , W. ; Emab , M. ; Hassan , R. and George , S. (2002) . Plasmid profile as fingerprinting of typing *Pseudomonas aeruginosa* . P. 12-13 .
15. Hindler , J. (1998) . Antimicrobial susceptibility testing . In:Essential procedures for clinical microbiology press . Washington . U.S.A .
16. Iwalokun , B.A.; Akinsinde , K.A.; Lanlenhin, O. and Onubogu, C. (2006) . Bacterio cinogenicity and production of pyocins from *Pseudomonas aeruginosa* species iso lated in Lagos, Nigeria. Afr. J. of Biotechnology . Vol. 5(11) : 1072-1077 .
17. Jack, M. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* in vivo. Acquire resistance to Chloramphenicol , Carbenem, Co- trimoxazole, Gentamycin nd Beta- lactame group antibiotics, Lancet, II:1181-1183 .
18. Jane , M. (2007) . Clinical in vestigation the prevalence and resistance patterns of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units in auniversity hospital . Turk . J . Med . Sci . 35 : 317-322.
19. Jone, D. (2009). Transmissible drug resistance of *E.coli* and *Salmonella* from humans, animals, and their rural environments. J. Infect. Dis. 132:296-302
20. Jawetz, E., Melnik, J.L. ; Adelberg , E.A.; Brook, G.F.; Butel, J.S. and Morse , S.A. (2004). Medical microbiology 24th. ed. Appleten and Lang New York. Connctical. PP.45-60 .
21. Jawetz, E., Melnik, J.L. ; Adelberg , E.A.; Brook, G.F.; Butel, J.S. and Morse , S.A. (2008). Medical microbiology 26th. ed. Appleten and Lang New York. Connctical. PP.45-60 .
22. Jelsbak, L.H. Johansen , A. Frosl, R. Thogersen and Thomsen , L.E. (2007). Molecular epidemiology and dynamics of Pseudomonas aeruginosa populations in Lungs of cystic fibrosis Patients . Infect . Immun . 75:22-50 .
23. Kelley, T.; Pancorbo, O.; Marka, W. and Barnhart, H. (1998). Antibiotic resistance of bacterial litter isolates, J. Poulta Sci, 77:243-247 .
24. Kill, K.; Binnewies , T.T. , Willenbrock, H.; Hansen, S.K. Lars Jelsbak, L.; Ussery, D.W.; and Friis, C. (2008) . Compartive Genomic of *Pseudomonas* In : *Pseudomonas* (ed) by Rehm, B.H.A. WILEY VCH P.1-25 .
25. Malekzadeh , A. ; Jonathan , L. ; Adler , M. ; Maxwell , M. (1971) . Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Chronically infection in India BMC Microbiol., 5:43-46 .
26. Marchandin, H.; Jean, H.; Dechamps, C.; Sirot, D.; Darbas, H.; Perigault, P. and Carriere, C. (2000). Production of a TEM.24 Plasmid- Mediated Extended- Spectrum- β- lactamase by aclinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa* . Antimicrob. Agents Chemotler., 44:213-216 .
27. Masaadeh, A.H. and Jaran, S.A. (2009) . Incident of *Pseudomonas aeruginosa* in post-operative Wound infection Am. J. Infect . Dis, 5:1-6 .
28. Milatovic, D.; Schmitz, F.; Brisse, S.; Verhoef, J. and Fluit, A. (2000). In vitro Activities of Sitfloxacin (Du-6850) and six other Fluoroquinoloes against 8, 796. Clinical Bacterial isolates. Antimicrob. Agents Chemother., 44:1102-1107.
29. Mims , C. ; Dockrell , H.M. ; Goering , R.V. ; Roitt , I. ; Wakelin , D. and Zuckerman , M. (2004) . Medical Microbiology 3rd ed. Mosby of Elsevier limited
30. Paterson , D. L. and Bonomo , R. A. (2005) . Extended – Spectrum β-Lactmases : aclinical update . clin Microbiol Rev 18, 657-686 .
31. Poirel, L.; Lambert, T.; Turkoglu, S.; Ronco, E; Gaillard, J. and Nordmann, P. (2001). Characterization of Class 1 integron from *Pseudomonas aeruginosa* that contain the bla vim-2 Carbapenem – Hydrolyzing β-lactamase Gene Cassettes. Antimicrob- Agents Chemother., 44:546-552
32. Priefer , U. (1984) . Isolation of plasmid DNA . Advanced molecular genetics by puhler , A. and Timmis , K. spriger verlug , Berlin
33. Sambrook, J. Maniatis, T.; and Fritsch, E.F. (1989) . Molecular cloning. A laboratory manual. Cold spring laboratory . Coldspring. New York .

34. Watine, J. (1999). Is the European interhospital clonal spread of serotype O12 *Pseudomonas aeruginosa* related to the patients prolonged Carriage duration . Infection Control and Hospital Epidemiology, 20 (7):460-461 .
35. Watine, J.; Haconi, J. and Vidal, I. (1999). Is hospital to hospital spread of multiple drug- resistant O12 *Pseudomonas aeruginosa* strains related to prolonged carriage by patients and or infection by specific habits in the hospitals involved,? Path. Biol., 47(5):457-461 .
36. Willenbrock , H. and Ussery , D.W. (2007) . Prediction of highly expressed genes in microbes based on chromatian accessibility . BMC Mol Biol , 8, 11 .
37. Willenbrock , H.; Friis, C.; Friis, A.S. and Ussery, D.W. (2006). An environmental Signature for 323 Microbial genomes based on Codon adaption indices Genome Biol , 7 , R114 .
38. Fritsche, T.R. ; Swoboda, S.E.; Olson, B.J.; Moore, F.M.; Meece, J.K. and Novicki, T.J. (2011) . Evaluation of The Sensititre ARIS2x and Vitek 2 Automated Systems for Identification of Bacteral Pathogens Recovered from Veterinary Specimens. Marshfield labs. LACROSSE. University of Wisconsin.
39. Chatzigeorglou, K.S.; Slafakas, N.; Petinaki, E.; Argyropoulou, A.; Tarpatzi, A.; Bobola, M.; Panlaro, O.; Velegraki, A. and Zerva, L. (2010) . Identification of *Staphylococci* by Phoenix : Valldation of anew protocol and Comparison with Vitek 2 . Diagn . Microbiol. Infect. Dis.68:375-381.

Astudy of Plasmid Contents of *P.aeruginosa* and thers relation to Antibiotic resistance

Azhar n. hussen luma foad m.

College of education

Abstract:-

Two- hundred clinical samples from burns infection with wounds, ear, nose, and upper respiratory tract were collected from the in- and out-patients of Al-Diwaniya Teaching Hospital and Al-Diwaniya paediatric and Cynecology Hospital from October 2010 to March 2011.

One hundred and fifty samples gave positive teaching results of bacterial growth (75%) depending on the cultural and microscopic features, the biochemical tests and confirmative (Vitek) system to get a presice diagnosis .

Thirty *Pseudomonas aeruginosa* isolates (20%) were identified. The snsceptibility of this bacteria tow and antibiotics was tested. The bacteria showed a high resistance to nine antibiotics; while the sensitine to Ciprofloxacin was 46.66%.

Fifteen isolates of *Pseudomonas aeruginosa* were selected to study the plasmid profile based on their resistance to antibiotics profile . The results revealed that 10 isolates contained small and large plasmid bands. Also, these isolates showed various levels of resistance to antibiotics. However, 5isolates did not contain any plasmid bands and they showed amulti- resistance to antibiotics.