------مجلة علوم الرافدين، المجلد 27، العدد 1، ص 1-9، 2018------

التحري عن انزيمات بيتالاكتاميز المعدنية (نوع IMP) في بعض انواع الجراثيم السالبة لصبغة گرام بالطرق المظهرية والجزيئية

سحر لقمان السليم **اديبة يونس شريف**

قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة الموصل

(أُستلم 23/ 9 /2013 ؛ قُبل 20 /1/2014)

الملخص

تم في هذه الدراسة التحري عن قدرة الانواع الجرثومية السالبة لصبغة گرام المعزولة من حالات مرضية مختلفة على انتاج انزيمات بيتالاكتاميز المعدنية (MBL) Metallo β-lactamase بالطرائق المظهرية والجزيئية، بلغت نسبة تواجدها (23.3%) بطريقة Imipenem-EDTA Disk Method، وكان لجرثومة *Pseudomonas.aeruginosa* أعلى نسبة حيث بلغت (10%) تلتها جرثومة *Klebsiella pneumoniae* (6.6%) و(3.3%)، لجرثومة *Enterobacter colcoae*، أما بالطرائق الجزيئية فقد تم استخدام تقنية الـ PCR للكشف عن الجين المشفر لهذه الانزيمات، فقد بلغت نسبة عزل جين bla_{IMP} (16.6%) واظهرت النتائج وجود هذا الانزيم في جرثومة *Ps.aeruginosa* بنسبة (11.1%)، فيما بلغت نسبة عزل الجين من جرثومة *Acinetobacter bumannii* (5.5%).

الكلمات الدالة: انزيمات بيتالاكتاميز المعدنية، مقاومة الجراثيم السالبة لصبغة گرام.

Detection of IMP-Metallo Beta-lactamase in Some Gram Negative Bacteria Using Morphological and Molecular Methods

Sahar L. Al Saleem **Adeeba Y. Sharif**

Department of Biology/ College of Science/ University of Mosul

ABSTRACT

This study detected the ability of some gram negative bacteria isolated from different clinical specimens to produce Metallo Beta Lactamase (MBL) using phenotypic and molecular methods. The ratio of the presence of these enzymes was (23.3%) using the Imipenem EDTA-Disk method and *Pseudomonas aeruginosa* was the highest producer 10% then *Klebsiella pneumoniae* (6.6%) and (3.3%) for *Enterobacter colcoae*, while the molecular method was used for the detection of gene for this enzyme, the results showed that *Ps.aeruginosa* produces the enzyme at (11.1%) while the rate of this gene produced by *Acinetobacter bumannii* was (5.5%).

Keywords: Metallo Beta lactamase, Gram negative bacteria resistance.

المقدمة

تعد أنزيمات Metallo β-lactamase (MBL) مجموعة من انزيمات بيتالاكتاميز المحللة لكل أنواع مضادات البيتالاكتام ومن ضمنها السيفالوسبورينات الواسعة الطيف والـ Carbapenems وتثبط هذه الانزيمات خارج الجسم الحي (*in vitro*) بالعديد من المركبات مثل: $CuCl_2$, $FeCl_2$, EDTA ومركبات الثايول ولكن لا تثبط بمثبطات بيتالاكتاميز مثل Sulbactum, Clavulinic acid والـ Tazobactam، وذلك لان مثبطات هذه الانزيمات هي من المواد الكلابية والتي تعمل على سحب ايونات الزنك من الموقع الفعال للانزيم مما يثبط من عمله حيث ان انزيمات MBL تحتاج إلى ايون ثنائي التكافؤ وعادة ما يكون الزنك عاملاً مساعداً لفعالية الانزيم، وأن المضادات الحيوية التي تستخدم في معالجة الجراثيم التي تبدي مقاومة متعددة والمنتجة لانزيمات MBL تشمل Aztreonam، Colistin، والـ PolymyxinB (Coossens, 2000). تم الكشف عن أنزيم MBL لأول مرة في جرثومة *Pseudomonas aeruginosa* في اليابان عام (1988) والتي أصبحت مستودعا لما يسمى بـ (IMP-type)، وهي فعالة على مضاد الـ Imipenem وتوجد حالياً أنواع مختلفة من هذا الأنزيم والذي انتشر إلى أنواع جرثومية أخرى مثل *Pseudomonas* spp. و *Acinetobacter* spp. وانواع تابعة للعائلة المعوية *Enterobacteriaceae* (Watanabe *et al.*, 1991; Senda *et al.*, 1996; Hirakata *et al.*, 1998). إن التحري عن هذه الأنزيمات والسيطرة عليها يعد مسألة مهمة لعدة أسباب، منها انها غالبا ما تكون مرتبطة مع مقاومة لبعض أو كل أنواع المضادات و أنَّ الجراثيم الاكثر مقاومة مثل سلالات جرثومية *Acinitobacter, Pseudomonas* والتي لها القدرة على انتاج هذه الأنزيمات بإمكانها أن تنشر هذه الأنزيمات إلى بقية افراد العائلة المعوية والتي تكون فيها آلية المقاومة غير مميزة أو معروفة (Peleg *et al.*, 2005).

وتعد مضادات الـ Carbapenems عاملاً او مضاداً فعالاً بين أنواع مضادات البيتالاكتام لعلاج الالتهابات المختلفة التي تسببها العصيات السالبة لصبغة گرام وذلك لفعاليتها وثباتيتها العالية ضد العزلات التي تمتلك انزيمات بيتا–لاكتاميز المعدنية (Yan *et al.*, 2001)، وغالبا ما يستخدم خيارا أخيرا للمضادات حيث أنها تبقى مقاومة للتحلل بإنزيمات بيتالاكتاميز المنتجة من قبل الأنواع الجرثومية، اضافة إلى أن لها طيفاً واسعاً من الفعالية مقارنة مع غيرها من مضادات بيتالاكتام (Arakawa *et al.*, 1995; Tsakris *et al.*, 2000).

يهدف البحث الى التحري عن تواجد انزيمات بيتا لاكتاميز المعدنية MBL من نوع IMP في الجراثيم قيد الدراسة بالطرق المظهرية والجينية.

المواد وطرائق العمل

العينات:

استخدمت في الدراسة عدد من الانواع الجرثومية السالبة لصبغة كرام والتي شملت *Ps.aeruginosa، E.coli، K.pneumoniae، Ent.colcoae، Ser.odofera، Pr.mirabilis، A.bumannii* والتي تم عزلها من دراسة سابقة من حالات مرضية مختلفة شملت التهابات الاذن الوسطى، الانف، الحنجرة، العيون، الحروق، القصبات الهوائية، الادرار، الدم، الجروح والمهبل، والتي تم تشخيصها بالطرائق الكيموحيوية وبالاعتماد (Koneman *et al.*, 1997; MacFaddin, 2000)، وتم تأكيد تشخيصها باستخدام اشرطة API.

تحضير محلول 0.5 mM EDTA

تم تحضيره كما يأتي (Yong *et al.*, 2002):

1- أذيب 186.1غم من Disodium EDTA. $2H_2O$ في 1 لتر ماء مقطر.

2- ضبط الأس الهيدروجيني عند 8.0 باستخدام NaoH.

3- عقم بالموصدة.

ولغرض تحضير محلول EDTA بتركيز 750µg اذيب 0.075 غم/مل من الـ EDTA و 0.0292 غم/مل للحصول على تركيز 292µg.

1- الطرائق المظهرية

طريقة Imipenem-EDTA Disk Method

تعتمد هذه الطريقة على تأثير محلول EDTA التثبيطي لانزيمات بيتالاكتاميز المعدنية حيث لقحت العينات قيد الاختيار على وسط اگار مولر- هنتون. تم وضع قرصين لمضاد Imipenem (10µg) على سطح الوسط الزرعي واضيفت لاحد القرصين (5) مايكروليتر من محلول EDTA بتركيز (750µg)، أعيدت نفس الطريقة بإضافة (292µg) من تركيز EDTA للطبق الآخر بدل التركيز (750µg)، وذلك لتحديد التركيز الامثل لتثبيط انزيمات MBL، حضنت الاطباق بدرجة حرارة (35) م° لمدة (18-24) ساعة.

بعدها قورنت منطقة التثبيط لقرص الـ Imipenem لوحده وقرص الـ EDTA + Imipenem وعد زيادة قطر منطقة التثبيط لقرص المضاد الحيوي مع EDTA نتيجة موجبة لهذا الاختبار والذي يُعَدُّ دليلا على وجود انزيمات بيتالاكتاميز المعدنية (Arakawa *et al*., 2000; Yong *et al*., 2002).

2- الطرائق الجزيئية للكشف عن جينات انزيمات بيتالاكتاميز المعدنية

1. استخلاص الـ DNA من العزلات الجرثومية:-

تم استخدام العدة المجهَّزة من قبل شركة Omega الامريكية لغرض استخلاص الحامض النووي DNA من العزلات الجرثومية قيد الدراسة، حيث تم تلقيح وسط Trypton soy broth بالمستعمرات الجرثومية الفتية ومن ثم حضنت بدرجة حرارة (35) م° لمدة (18-24) ساعة، بعدها تم اتباع خطوات الاستخلاص وحسب تعليمات الشركة المجهزة، وبعد اجراء عملية الاستخلاص حفظت مستخلصات الحامض النووي بالتجميد عند درجة (20-) م°.

2. تقدير تركيز ونقاوة DNA

تم تقدير التركيز والنقاوة للحامض النووي DNA المستخلص من العينات التي شملتها الدراسة باستخدام جهاز الـ Spectrophotometer, Biodrop انكليزي المنشأ.

3. الكشف عن انزيمات البيتالاكتاميز المعدنية بطريقة الـ PCR.

تم الكشف عن انزيمات بيتا لاكتاميز المعدنية بالاعتماد على طريقة (Senda *et al*., 1996) للكشف عن الجين bla_{Imp}، تم تجهز بوادئ تسلسلات الـ DNA لانزيمات البيتالاكتاميز المعدنية Metallo-β lactamase من شركة The midland certified reagent company INC. (Texas)

$^{5'}$-ACCGCAGCAGAGTCTTTGCC-$^{3'}$
$^{3'}$-ACAACCAGTTTGCCTTACC-$^{5'}$

4. التفاعل التضاعفي لسلسلة DNA باستخدام تقنية الـ PCR

أُجري الاختبار باعتماد جهاز التضخيم الحراري (Mastercycler Personal, Eppendorf) الالماني المنشأ وبالخطوات الآتية:

1- تم تعقيم مكان العمل والاجهزة قبل البدء بالعمل باستخدام الفورمالين ثم ارتداء الكفوف والكمامات المعقمة لتجنب حصول التلوث.

2- رقمت انابيب ابندروف حجم (0.2) سم^3 المعقمة بعدد العينات المختبرة.

3- حضر خليط من محتويات التفاعل لسهولة انجاز العمل إذ تم تحضير الخليط بمعدل 25 مايكروليتراً من الحجم التفاعلي لكل انبوب والذي يتكون من:-

المكونات	الحجم
Gotag^R Green Master Mix	12.5µl
F-R primer, 10mm	3 µl
DNA template	4 µl
Nuclease free water	5.5 µl

4- مُزجت محتويات انابيب ابندروف بجهاز Vortex Mixer.

5- وضعت انابيب ابندروف الحاوية على المواد اعلاه في جهاز Thermal Cycler وتمت برمجة الجهاز حسب البرنامج الخاص بالباديء:

المسخ الاولي initial denaturation عند درجة حرارة (94) م° لمدة دقيقتين تبعتها (30) دورة من المسخ denaturation عند درجة (94) م° لمدة دقيقة واحدة، تم الارتباط annealing عند درجة (55) م° لمدة دقيقة واحدة، والاستطالة extension عند درجة (72) م° لمدة دقيقة ونصف لغرض اكمال عملية التضخيم (Senda *et al*., 1996).

طريقة الترحيل الكهربائي للـDNA في هلام الاكاروز:

تم الكشف عن عينات الـ DNA، وناتج تفاعلات PCR بتقنية الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز Agarose gel electrophoresis باتباع الخطوات التالية:

1- حُضِّرَ الأكاروز بتركيز 1% بإذابة 2غم من الأكاروز في 200 سم^3 من محلول TAE 1X buffer، وذلك للكشف عن الـ DNA الذي تم استخلاصه وتمت الإذابة في درجة الغليان، وتُرِكَ المحلول ليبرد إلى درجة حرارة 55°م.

2- تم تركيب قالب الهلام Gel tray ثم وُضِعَ المشط Comb لِصُنعِ الحفر wells التي تستخدم لتحميل عينات الـ DNA.

3- سُكِبَ الأكاروز في القالب مع ملاحظة تجنب تكون فقاعاتٍ هوائيةٍ، وتُرِكَ الهلام إلى أن تصلب ثم رفع المشط.

4- أُضيف 5 مايكرو ليتر من صبغة التحميل إلى 10 مايكرو ليتر من نواتج تضخيم الجينات قيد الدراسة ثم وضعت في الحفر.

5- وُضِعَ القالب مع الهلام في الحوض المملوء بـ 1X من TAE حيث غطى هذا المحلول سطح الهلام.

6- تم تشغيل مجهز القدرة Power Supply وضُبِطَ عند 80 فولت مدة 90 دقيقة.

7- صُبِغَ هلام الأكاروز بصبغة بروميد الاثيديوم عن طريق غمرها بالماء المقطر الحاوي على هذه الصبغة لمدة ساعة.

8- فحص الهلام في غرفة مظلمة، وذلك بتعريضه للأشعة فوق البنفسجية بوضعه على جهاز U.V، وصُوِّرَ الهلام باستخدام كاميرا رقمية.

9- قُدِّرَ الحجم الجزيئي لقطع DNA بمقارنة موقع الحزمة وسمكها مع الدليل الحجمي القياسي DNA-Ladder (Sambrook and Russel, 2001).

النتائج والمناقشة

التحري عن أنزيمات بيتالاكتاميز المعدنية

تعد أنزيمات بيتالاكتاميز المعدنية Metallo Beta lactamase (MBL) أنزيمات متنوعة تختلف في قابليتها على تحليل مضادات الـ Carbapenem وأنواع أخرى من مضادات البيتالاكتام (Peleg *et al*., 2005).

تستخدم المواد المثبطة لأنزيمات MBL لوحدها مرتبطة أو مركبة مع مواد كلابية chelators لغرض تفعيل أو تقوية مضادات الـ Carbapenem أو الـ Ceftazidim ومنها مركبات الثايول والتي تضم 2mercaptopropionic Acid وبعض أملاح المعادن الثقيلة مثل $CuCl_2$، $HgCl_2$ والـ EDTA. كما أنه من الضروري اختيار المواد الكلابية لوحدها لغرض تحديد عدم إعطائها نتائج موجبة كاذبة من خلال تثبيطها للعزلة قيد الاختبار (Ratkai *et al*., 2009)، ولهذا الغرض تم استخدام طريقة Imipenem-EDTA Disk Method لغرض الكشف عن العزلات المنتجة لأنزيمات MBL (Yong *et al*., 2002).

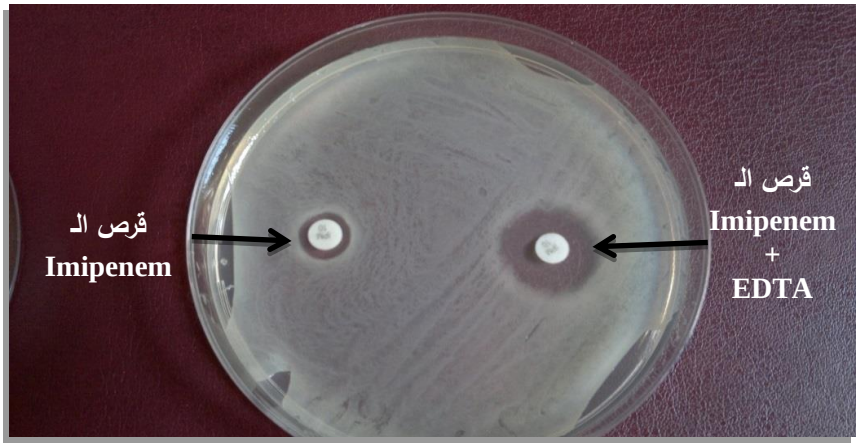
يوضح الجدول (1) نتائج هذا الاختبار حيث أظهرت (7) عزلات من مجموع (30) عزلة قابليتها على إنتاج هذه الأنزيمات اي بنسبة (23.3%)، وكان لجرثومة *Ps.aeruginosa* اعلى نسبة حيث بلغت (10%) تلتها جرثومة *K.pneumoniae* (6.6 %) ولقد تم الكشف عن جينات MBL لأول مرة في جرثومة *Ps.aeruginosa* قبل ظهورها في الأنواع الاخرى من الجراثيم المعوية مثل *K.pneumoniae*، *E.coli*, *Enterobacter* spp، لذلك فمن المحتمل أن تكون جرثومة الـ *Pseudomonas* قد نقلت بلازميداتها الحاملة لهذه الجينات الى بعض انواع العائلة المعوية لا سيما في حالة الاصابات المكتسبة من المستشفيات (Walash *et al*., 2005)، كما اشار الحسو (2006) الى مقاومة سلالات جرثومة *Ps.aeruginosa* لمضادات البيتالاكتام واسعة الطيف بما فيها سيفالوسبورينات الجيل الثالث وكذلك مضادات الـ Monobactams، Cephamycins، Carbapenems التي تكون فعالة ضد العديد من العصيات المعوية السالبة لصبغة كرام وهذا يعود على امتلاك هذه الجراثيم للعديد من آليات المقاومة مثل انزيمات البيتالاكتاميز بأنواعها المختلفة وخاصة الانزيمات المعدنية القادرة على تحليل مضادات الـ Carbapenems.

الجدول 1: العزلات الجرثومية الموجبة لاختبار Imipenem- EDTA Disk test ونسبها المئوية.

النوع الجرثومي	عدد العزلات المختبرة	العزلات الموجبة للاختبار العدد (%)
Ps. aeruginosa	9	3 (10)
E. coli	5	0
K.pneumoniae	5	2 (6.6)
E. colcoae	3	1 (3.3)
Ser.odofera	2	0
Pr.mirabilis	1	0
A.bumannii	5	1 (3.3)
المجموع الكلي	30	7 (23.3)

توضح الصورة (1) النتيجة الموجبة لهذا الاختبار حيث يلاحظ اتساع منطقة التثبيط عند اضافة الـ EDTA لقرص الـ Imipenem. إنّ حجم منطقة التثبيط يساعد في التمييز بين العينات التي يشك في امتلاكها لأنزيمات MBL. حيث أن منطقة التثبيط لقرص الـ Imipenem- EDTA كان أقل أو مساوية لـ 14 ملم للعزلات التي كانت سالبة لإنتاج أنزيمات MBL، فيما كانت أكثر أو يساوي لـ 17ملم للعزلات التي كانت موجبة لأنزيمات MBL. إنّ قرص الـ Imipenem المضاف إليه 750 µg من الـ EDTA أعطى نتائج مماثلة حيث أن استخدام التركيز 292 µg من الـ EDTA لم يعطِ نتائج موجبة في الكشف عن هذه الأنزيمات في نفس العزلات التي اعطت نتائج موجبة عند استخدام التركيز 750 µg، لذا يعد هذا التركيز من الـ EDTA هو

التركيز الافضل (Tsakris *et al*., 2000). إنَّ وجود المقاومة لمضادات الـ Carbapenem في بعض الأنواع الجرثومية السالبة لصبغة گرام قد يظهر نتيجة مشاركه مضخات الضخ خارج الخلية أو نتيجة نقص في نفاذية الغشاء (Livermor and Woodford, 2002)، ويعتمد الاختلاف في نسبة تحلل الـ carbapenems على حركة الجين المشفر لأنزيمات MBL (Yan *et al*., 2004)، حيث أنَّ الجين المشفر لهذه الأنزيمات يمكن أن يكون موقعه على الكروموسوم الجرثومي، البلازميد أو العناصر القافزة، والتي هي عناصر جينية متحركة وبذلك تتمكن من الحركة والانتشار (Franklin *et al*., 2006; Safha *et al*., 2008). كما أن بعض العزلات تكون حساسة للـ Imipenem مع أنّها تكون حاملة للجين *bla Imp* عند الكشف عنه بالطرائق المظهرية ومن المحتمل أن يكون السبب نظام التنظيم الثانوي Secondary Regulatory System والذي ينتج عنه ظهور جين صامت أو خفي (Senda *et al*., 1996)، كما أن نسبة الـ Imipenem المتحلل بالانزيم قليلة وذلك لقلة جرعة الجين gene dosage والتي تعكس عدد نسخ البلازميدات الموجودة في الجراثيم (Hirakata *et al*., 1998)، اذ صف (23) نوعاً مختلفاً من عائلة هذه الأنزيمات ومنها VIM-MBL التي عزلت من إيطاليا عام (1997) من منطقة فيرونا Verona و SPM-MBL الذي عزل من ساوباولو في البرازيل. أما النوع الحديث من أنزيمات MBL والذي اكتشف عام (2002) هو GIM-MBL والذي عزل من ألمانيا (Toleman *et al*., 2002; Walsh *et al*., 2003; Chu *et al*., 2004).



الصورة 1: نتيجة اختبار التحري عن أنزيمات الـ MBL بطريقة

Imipenem-EDTA Disk Method

وقد أصبح الجين *bla*$_{Imp}$ الذي يشفر لانزيمات البيتا لاكتاميز المعدنية المحللة لطيف واسع من مضادات بيتالاكتام منتشراً في مناطق كثيرة من العالم، لذا فإنَّ الكشف المبكر عن العزلات المنتجة لهذه الأنزيمات قد يساعد في الحد من انتشار المقاومة الجرثومية لهذه المضادات (Peleg *et al*., 2005). تنتشر العصيات السالبة لصبغة گرام والتي تحمل الجين *bla*$_{Imp}$ وتسبب حالات وبائية في المستشفيات وأنَّ التحري عن هذه الجينات بطريقة الـ PCR عادة ما تعطي نتيجة جيدة ودقيقة حيث أنها تستخدم للكشف عن الجين المشفر لهذه الأنزيمات فيما تستخدم طريقة Imipenem- EDTA Disk- Method للكشف عن نواتج هذه الأنزيمات (Yong *et al*., 2002).

يبين الجدول (2) النسب المئوية للجراثيم السالبة لصبغة گرام والتي تمتلك جين *bla*$_{Imp}$، حيث يلاحظ أن نسبة جرثومة *Ps.aeruginosa* والتي تمتلك الجين *bla*$_{Imp}$ كانت (11.1%) من مجموع العزلات المختبرة بهذه الطريقة البالغ (18) عزلة، فيما بلغت نسبة جرثومة *Acineto bumannii* (5.5%). تعد جرثومة *Ps.aeruginosa* إحدى أكثر العزلات المسببة لحالات وبائية في المستشفيات وأن انتشار هذه العزلات والتي تحمل جين *bla*$_{Imp}$ قد تشجع انتقال جين المقاومة إلى أنواع اخرى من العصيات السالبة لصبغة گرام الضارية مثل جرثومتي *E. coli* و*Klebsiella*. كما أشارت بعض الدراسات إلى أن هذه الأنزيمات في معظم الأنواع الجرثومية المنتجة لها يكون أصلها من حالات وبائية عزلت من مرضى راقدين في المستشفيات لفترات طويلة، وإنَّ الكشف عن هذه الأنزيمات له أهمية كبيرة لغرض تشخيصها ولإعطاء المضاد المناسب كما أنه يساعد في السيطرة على الحالات

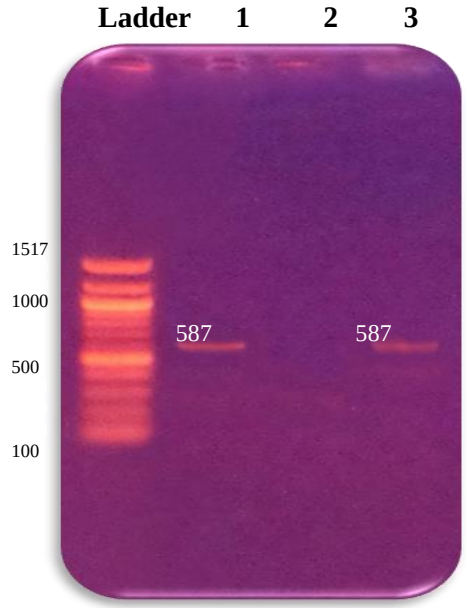
الوبائيـــــة التـــــي تســـــببها والحـــــد مـــــن انتشـــــار هـــــذه الأنزيمـــــات لأنـــــواع جرثوميـــــة أخـــــرى (Toraman *et al.*, 2004; Peirano *et al.*, 2011). وقد أدى انتشار انزيمات MBL بصورة واسعة إلى نشوء حالة يَصعُبُ فيها علاج الالتهابات الناتجة عن الجرثومة السالبة لصبغة گرام الوبائية، لذا فإن استخدام الاختبارات المظهرية البسيطة في المختبرات والمستشفيات للكشف عن الأنواع الجرثومية التي تمتلك هذه الانزيمات يعد ضرورياً جداً (John and Balagurunathan, 2011).

الجدول 2: النسب المئوية للتحري عن الجين bla_{Imp} من العزلات الجرثومية قيد الدراسة بتقنية PCR

الأنواع الجرثومية	عدد العزلات المختبرة	العزلات الموجبة	النسبة المئوية
Ps.aeruginosa	6	2	11.1
E. coli	3	0	0
K. pneumoniae	3	0	0
E.colacae	2	0	0
A.bumannii	4	1	5.5
المجموع	18	3	16.6

توضح الصورة (2) نتائج الترحيل الكهربائي لـ DNA العزلات الموجبة لاختبار التحري بتقنية الـ PCR وظهور الحزم عند الوزن الجزيئي (587 bp.) الخاصة للبادئ المستخدم دليلا على النتيجة الموجبة للجين bla_{Imp} في العزلات المختبرة.

وللمستقبل فإنَّ الاختبارات المظهرية المستخدمة في التحري عن أنزيمات MBL يجب أنَّ تكون ضمن اختبارات الحساسية الروتينية، يتبعها اختبارات أكثر تخصصية مثل الاختبارات الجزئيية والتي تمتلك قدراً واسعاً من الكفاءة والتخصص إذا أمكن توفيرها وهذا من شأنه ان يساهم في الحد من ظاهرة انتشار المقاومة (Thomson, 2010).



الصورة 2: نواتج تفاعل الـ PCR لأنزيمات MBL

1. *A.bomanii*, 2. *E.coli* 3.*Ps.aeraginosa*

المصادر العربية

الحسو، محمود زكي سلميان سلطان (2006). استخلاص وتنقية أنزيمات البيتالاكتاميز من بعض العصيات السالبة لصبغة گرام المعزولة من اصابات الجهاز التنفسي السفلي ودراسة بعض خصائصها. اطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة الموصل.

المصادر الأجنبية

Arakawa, Y.; Murakami, M.; Suzuki, K.; Ito, H.; Wacharotayankun, R.; Ohsuka, S.; kato, N; ohta, M. (1995). Anovel Integron- Like Element carrying the Metallo- β - lactamase Gene bla_{IMP}. *Antimicrob. chemother.*, **39**, 1612- 1615.

Arakawa, Y.; Shibata, N., Shibayama, K.; Kurokawa H.; Yagi, T.; Fujiwara, H; Goto, M. (2000). Convenient Test for Sereening Metallo-β-Lactamase producing Gram-Negative Bacteria by using Thiol Compounds. *J. Clin. Microbiol*, **38**, 40-43.

Chu, Y.M.; Afzal-Shah, M.; Hovang, E.T.; Palepou, M.F.; Lyon, D.J.; wood ford, N. (2004). Anovel MBL from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998- *Antimicrob Chemother*, **45**, 710-714.

Coossens, H. (2000). (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection) results from Europe: comparison of antibiotic susceptilities between countries and center types. *J. Antimicrob. Chemother.*, **46**, 39-52.

Franklin, C.; Liolios, L.; Peleg, A.Y. (2006). Phenotypic Detection of Carbapeneme-Susceptible Metallo-β-Lactomase-Producing Gram. Negative Bacilli in the Clinical Laboratory. *J. Clin. Microbiol*., **44**, 3139-3144.

Hirakata, Y.; lzumikawa, K.; Yamaguchi, T.; Takemura, H.; Tanaka, H.; Yoshida, R.; Mastuda, J.; Nakano, M.; Tomono, K.; Maesaki, S.; Kaku, M.; Yamad, Y.; Kamihira, S.; koino, S. (1998). Rapid Detection and evaluation of clinical characteristics of carrying the metallo-β-lactamse Gene bla_{IMP}, *Antimicrob. Chemother.*, **42**, 2006- 2011.

John, S.; Balagurunathan, R. (2011). Metallo beta Lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii*. *India J. Med. Microbiol.*, **29**, 302-304.

Koneman, E.W.; Allen, S.D.; danda, W.M, Schreck enberger pc and winn, WC.(1997). Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology. 5th(ed). Lippin- cot- Raven publisher, Philadephia, USA. pp. 201-245.

Livermore, D.M.; Woodford, N. (2002). Carbapenemase A problem in waiting? *Curr. Opin. Microbiol.*, **3**, 489-495.

Macfaddin, J.F. (2000). Biochemical Tests for Identification Bacteria. Lippincott Williams and Wilkns. Philadelphia, USA. pp.249-260.

Peirano, G.; Benthey, J.A.; Wood ford, N.; Pitout, J.D. (2011). New Delhi Metallo β-Lactamase from Traveler Returning to Canada. *Antimicrob. Chemother.*, **17**, 242-244.

Peleg, A.Y.; Franklin, C.; Bell, J. M.; Spelman, D.W. (2005). Dissemination of the Metallo β-Lactamase Gene blaIM$_P$- 4 among Gram-Negative pathogens in a clinical setting in Australia. *Clinic. Infec. Dis*., **41**, 1549-1556.

Ratkai, C.; Quintera, S. ; Crosson, F.; Monteiro, N.; Nagy. E.; peixe, I. (2009). Controlling for False positives: interpreting MBL Etes and MBL combined disc test for the detection of metallo-beta- Lactamases. *J. Antimicrob. Chemother*, **64**, 657- 658.

Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning*. 3rd.ed., Cold spring Harbor Laboratory Protocols, Cold Spring Harbor, New York.

Senda, K.; Arakawa, Y.; Ichiyama, S. (1996). PCR detection of metallo β-lactamase gene (bla_{IMP}) in gram- negative rods resistant to broad- spectrum β-lactamase. *J. Clin. Microbiol*., **38**, 526-529.

Safha, P.H.; Wieczorek,P.;Hauschild, T.; Zor, A; wski, M.; Ozanska, D.W. and Tryniszhwsk, E.(2008). Metallo Beta Lactamases of *Pseudomonas aeruginosa*–anorel mechanisim resistance to Betalactam antibiotics. Folia Histochemica et cyto-biologica,46,137-142.

Thomson, K.S. (2010). Extended Spectrum β - lactamase, AmpC, and Carbapenemase Issues. *J. Clinic. Microbiol.*, **48**, 1019- 1025.

Toleman, M.A.; Simm, A.M. ; Murphy, T.A. (2002) Molecular characterization of SPM -1, anovel metallo β-Lactamases isolated in Latin America,: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance program. *J. Anti-microb. Chemother.*, **50**, 673-679.

Toraman, Z.; Yakupogullari, Y.; Kizirgil, A. (2004). Detection of metallo B-Lactomase production and antibiotic resistance with E-test method in *Pseudomonas, Acinetobacter* and *Klebsiella* strains in Turkey. *J. Infect. Chemother*., **10**, 257-261.

Tsakris, A.; Pournaras, S.; woodford, N.; Palepou, M.1.; Babini, G.S.; Douboyas, J.; Livermor, D.M. (2000). Outbreak of Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM- 1 carbapene- mase in Greece. *J. Clinic. Microbiol.*, **38**, 1290 – 1292.

Walsh, T.R.; Tolemenn, M.A.; ryniewicz, W.; Benett, P.M.; dones, R.N. (2003). Evolution of an integron carrying bla VIM-$_2$ in Eastern Europe: repot from the SENTRY Antimicrobial Survieillance Program. *J. Antimicrob. Chemother*., **25**, 116-119.

Watanabe, M.; Layobe, S.; Inoue, M.; Mitsuhashi, S. (1991). Transferable imipinem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Chemother*., **35**, 147-151.

Yan, J.J., Ko, W.C.; Tsai, S.H., Wu, H.M.; Wu, J.J. (2001). Outbreak of infection with multi-drug resistance *Klebsiella pneumoniae* carrying bla-IMP-8 in a univesting medical center in Taiwan, *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 4433-4439.

Yan, J.J.; Wu, J.J.; Tsai, S.H.; Chuang, C.L. (2004). Comparison of the Double- disk, Combined disk, and Etest methods for detecting metallo β - lactamass in gram- negative bacilli. *Diagn. Microbial. Infect. Dis*., **49**, 5- 11.

Yong, D.; Lee, K.; Yum, J.H.; Shin, H.B. (2002). Imipenem-EDTA Disk Method for Differentiation of Metallo-β-Lactomase- Producing Clinical Isolates of *Pseudomonas* spp. And *Acinetobacter* spp. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 3798-3801.