Received: 13/11/2019 Accepted: 17/2/2020 Published: 2020

الكشف عن بعض عوامل الضراوة لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من اصابات الجروح وتأثير بعض المضادات الحيوية عليها

الباحث سرى ستار حسن ا.م.د. اسماء عزت النعيمي
الجامعة المستنصرية، كلية التربية الاساسية، قسم العلوم
drasezzat@yahoo.com
biologistsura@yahoo.com

الخلاصة:
تم جمع 126 عزلة لإصابات سريرية لمصابين بجروح مختلفة من عدة مستشفيات في محافظة بغداد. ولغرض تشخيص عزلات بكتريا الزائفة الزنجارية *P. aeruginosa* تم زراعتها على الأوساط الزرعية، وسط المكونكي الصلب وسط السترمايد الصلب. تم إجراء الفحوصات الكيموحيوية Biochemical tests وقد ظهر إن عدد العزلات لبكتريا *P. aeruginosa* هي 25 عزلة من مجموع العزلات وبنسبة 19.48%. أظهرت 4 (16%)عزلات بكتيرية قابليتها على إنتاج الإنزيم الحال للدهون Lipase، فيما كانت جميع العزلات غير قادرة على إنتاج ألإنزيم المحلل لليوريا Urease، في حين أظهرت الدراسة بأن جميع العزلات البكتيرية لها القابلية على تحلل الجيلاتين Gelatinase وبنسبة 100%، وكانت 16عزلة منتجة للإنزيم الحال للبروتين Protease بنسبة 64%. وفي عملية الكشف عن قابلية العزلات البكتيرية على إنتاج السيدروفور Siderophore تبين إن جميع العزلات قادرة على إنتاجه وبنسبة 100%، التحري عن إنتاج العزلات للهيمولايسين Hemolysin فقد تبين إن 6عزلات بكتيرية فقط قادرة على إنتاجه بنسبة 24% عند تنميتها على وسط الدم الصلب أما باقي العزلات فكانت غير قادرة على إنتاجه. أبدت جميع العزلات البكتيرية التي تمت دراستها قابليتها على الحركة الإرتعاشية Twitching Motility والحركة السابحة Swimming motility بنسبة 100% في حين كانت 24 عزلة ما عدا عزلة واحدة فقط من العزلات غير قادرة على الحركة من نوع Bacterial Swarming بنسبة 96%. تم اختبار حساسية العزلات لستة أنواع من المضادات الحيوية باستعمال طريقة انتشار الأقراص Disk Diffusion Method حيث بينت النتائج بأنه مقاومة البكتريا للمضاد Ceftazidime 100%، في حين كانت 44% مقاومة للمضاد Ciprofloxacin، أما المضادين Tobramycin و Gentamicin فكانت 52% مقاومتها لكل نوع منهما، في حين لم تظهر أي عزلة من العزلات البكتيرية قيد الدراسة من مقاومة المضاد Imipenem، وبالنسبة للمضاد من نوع Gentamicin فقد كانت مقاومة العزلات البكترية له بنسبة 20%

الكلمات المفتاحية:
الزائفة الزنجارية، الجروح، الكيموحيوية، مقاومة ، مضاد حيوي ،عامل ضراوة .

الكشف عن بعض عوامل الضراوة لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من اصابات الجروح وتأثير بعض المضادات الحيوية عليها

الباحث سرى ستار حسن ا.م.د. اسماء عزت النعيمي

المقدمة:

إن بكتريا الزائفة الزنجارية *P. aeruginosa* عبارة عن عصيات rods سالبة لصبغة كَرام Gram-negative، وهي بكتريا إجبارية هوائية Obligate aerobic [1]وتمتاز بكونها متحركة motile بسبب وجود سوط قطبي واحد فيها Unipolar flagellum [2] تتراوح أبعاد هذه البكتريا بين(0.5 الى 0.8) ميكرومتر ، في حين يتراوح طولها بين (1.5 الى 3) ميكرومتر[3] ، وتتميز هذه البكتريا بامتلاكها القدرة على النمو في درجات حرارة مختلفة تصل إلى 42م [4]، يمكن تشخيص هذه البكتريا بصورة اولية عن طريق رائحة المستعمرات النامية لها على الوسط الزرعي الاساس الدم الصلب اذ ان لها رائحةمميزة تشبه رائحة العنب Grape-like odor لإنتاجها مركب Aminoacetophenone كما إنها تتميز بان لها بريقاً معدنياً [5]. إن العامل الرئيس في كون بكتريا *P. aeruginosa* مسبباً مرضياً هو مقاومتها الذاتية للمضادات الحيوية، ونتيجة لذلك فإن هذه البكتريا قد اكتسبت أهمية كبيرة في السنوات الحالية كونها سبباً مهماً في العدوى والإصابات في المستشفيات حيث إن لديها القابلية على البقاء قيد الحياة في بيئة المستشفيات ومختلف الظروف البيئية الأخرى[1]، تعمل بكتريا *P.aeruginosa* على إفراز العديد من الصبغات المختلفة الالوان ومنها البايوسيانين pyocyanin، بايوروبين pyorubin، البايوفردين pyoverdine والبايوميلانين pyomelanin. إن سبب تواجد هذه البكتريا وانتشارها في البيئات المختلفة يرجع إلى قدرتها على استخدامها لمركبات مختلفة كمصدر للطاقة، مثل الكاربوهيدرات carbohydrates والمركبات النتروجينية nitrogenous compounds كمصدر للكاربون وبهذا فهي لا تحتاج إلى عوامل نمو معقدة وهي لذلك مهمة جدا طبياً[6]. إن الامراضية في هذه البكتريا ترجع إلى عوامل الضراوة التي تمتلكها التي تضم كلاً من الشعيرات pili، الاسواط flagella ، البروتيز proteases ، الاستيز elastase، لايبيز lipases ، وعدد من السموم المختلفة التي تشمل بايوسيانين pyocyanin ، سيانيد الهيدروجين hydrogen cyanide، سموم الجهاز الافرازي من النوع Type III Secretion System toxins (T3SS)، السم الخارجي نوعA (exotoxin A)[7].

تتمييز بكتريا *P.aeruginosa* بامتلاكها عوامل ضراوة متعددة تجعلها قادرة على الاستيطان داخل جسم الكائن الحي المضيف لها مما يؤدي إلى إصابة هذا الكائن بالأمراض[8,9]. عوامل الضراوة تمكنها من الالتصاق واجتياح الكائن المضيف وذلك من خلال تدمير الاستجابة المناعية في المضيف وتكوين حاجز ضد المضادات الحيوية حيث تلعب دوراً مرضياً مهماً في الاستعمار colonization، بقاء البكتريا، واجتياح الأنسجة[10]. بسبب هذه الاهمية لذلك خضعت هذه البكتريا الى العديد من الدراسات لمعرفة عوامل ضراوتها ونمط استجابتها للمضادات الحيوية لايجاد الحلول المناسبة لعلاج خطر انتشار مقاومة هذه البكتريا.

المواد وطرائق العمل:

جُمِعَت 126 عزلة بكتيرية من جروح مرضى راقدين في استمرت عملية جمع العينات للفترة من 20\1\2019 ولغاية 25\3\2019 من مستشفيات مختلفة من محافظة بغداد وهي: مستشفى بغداد التعليمي / مدينة الطب، مستشفى الشهيد غازي الحريري / مدينة الطب، المختبرات التعليمية / مدينة الطب، مستشفى الكندي التعليمي. وقد شملت الجروح wounds اماكن متعددة من الجسم القدم، اليد، الرأس، منطقة الحوض، منطقة البطن ... الخ

تم جمع العينات عن طريق المسحات القطنية المعقمة sterilized cotton swaps وبعد ذلك نُقِلَت المسحات للمختبرات الخاصة بكل مستشفى لغرض العزل والتشخيص لبكتريا *P. aeruginosa*. تم نقل المسحات الخاصة ببكتريا الزائفة الزنجارية بوسطة اوساط ناقلة transport

media الى مختبر الدراسات العليا في قسم العلوم / كلية التربية الاساسية / الجامعة المستنصرية وذلك لغرض تشخيصها مرة اخرى واستخدامها للتجارب قيد الدراسة. وتم هذا التشخيص عن طريق زراعة العزلات البكتيرية على وسط الدم الصلب blood agar، وسط الماكونكي التفريقي الصلب MacConky agar، وسط السترامايد الصلب Cetrimide agar الخاص بنمو بكتريا *P. aeruginosa*فقط. وتم التأكد منها عن طريق اجراء الفحوص الكيموحيوية والتي تضمنت الاوكسيديز Oxidase test، الكاتليز Catalase test اختبارات IMVC، إختبار النمو على وسط كليجلر.

الكشف عن بعض عوامل الضراوة للبكتريا:

1- الانزيم الحال للدهون Lipease:

تم تلقيح وسط اساس الترايبيوتيرين الصلب Tributyrin Agar Base بمستعمرة بكتيرية نقية حديثة النمو عمرها يتراوح بين 18-24 ساعة منماة على الوسط المغذي الصلب Nutrient agar، بأستعمال طريقة التخطيط وتركت في الحاضنة لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37م. إنَ ظهور هالة حول مستعمرة البكتريا النامية هو دليل على ايجابية الاختبار [11].

2- الانزيم الحال لليوريا Urease:

تم تلقيح الانابيب الحاوية على وسط اليوريا الصلب Urease Agar Base بشكل مائل slant بمستعمرة بكتيرية عمرها يتراوح بين 18-24 ساعة منماة على الوسط المغذي الصلب Nutrient agar، باستعمال طريقة التخطيط وتركت في الحاضنة لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37م. وبعد إنتهاء فترة الحضن تمت قراءة النتيجة اذ اعطى الاختبار نتيجة موجبة عند تحول لون الوسط من البرتقالي الى اللون الوردي والعكس صحيح[11].

3- الانزيم الحال للجيلاتين Gelatin liquefaction:

تم تلقيح وسط الجيلاتين بمستعمرات بكتيرية حديثة النمو عمرها يتراوح بين 18-24 ساعة منماة على الوسط المغذي الصلب Nutrient agar وتركت الانابيب في الحاضنة لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37م، كما وُضِعَت انبوبة حاوية على الوسط وغير ملقحة بالبكتريا كمجموعة سيطرة سالبة وبعد انتهاء فترة الحضن وُضِعَت الأنابيب الحاوية على الزرع البكتيري في الثلاجة لمدة 30 دقيقة وبدرجة حرارة 4م. إنَ بقاء الوسط في الانابيب على حالته السائلة يدل على كون الأختبار إيجابياً [12].

4- الانزيم الحال للبروتين Protease:

تم تلقيح وسط حليب الفرز Skim milk بمستعمرة بكتيرية نقية حديثة النمو عمرها يتراوح بين 18 الى 24 ساعة ساعة منماة على الوسط المغذي الصلب Nutrient agar، بأستخدام طريقة التخطيط وتركت في الحاضنة لمدة 48 ساعة وبدرجة حرارة 37م. دلَ ظهور هالة باللون الشفاف حول المستعمرات البكترية على كون الاختبار إيجابياً[11].

5- إختبار إنتاج السيدروفور Sedrophore Production:

تمت زراعة المستعمرة المراد تشخيصها على وسط المرق المغذي Nutrient broth \، وتركت في الحاضنة لمدة 24 ساعة وتحت درجة حرارة 37م ثم بعد ذلك تم ترسيب الانابيب المحتوية على البكتريا في جهاز النبذ المركزي لمدة 15 دقيقة وبسرعة 8000 دورة / دقيقة (8586.24 قوة التسارع)، بعد ذلك تم اخذ 2 مللتر من الراشح واضيف اليه 500 مللتر من كلوريد الحديديك

$FeCl_3$ ذو تركيز2%. إنَ ظهور اللون الاحمر الغامق هو دليل على انتاج البكتريا للسيدروفور وايجابية الاختبار[13].

6- إنتاج الهيمولايسين Hemolysin Production:

زرعت المستعمرة البكتيرية المطلوب اختبارها وهي مستعمرة بكتيرية حديثة النمو عمرها - 2418 ساعة منماة على الوسط المغذي الصلب على وسط الدم الصلب بطريقة التخطيط، ثم وضعت الاطباق في الحاضنة لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37م، ان ظهور مناطق تحلل شفافة حول المستعمرات البكتيرية هو دليل على ايجابية هذا الاختبار[22].

اختبارات الحركة:

1- الكشف عن الحركة الارتعاشية Twiching motality:

تم تلقيح مستعمرة بكتيرية حديثة النمو عمرها يتراوح بين 18 الى 24 ساعة منماة على الوسط المغذي الصلب nutrient agar المطلوب اختبارها على وسط Twitching بطريقة الطعن بأستعمال اعواد اسنان خشبية Toothpick معقمة على ان يدخل داخل الوسط ويلامس أرضية الطبق من الداخل كما يجب احكام اغلاق الطبق جيداً بأستعمال البارفلم parafilm وذلك من اجل المحافظة على عدم تبخر ماء الوسط، ثم تحضن لمدة 24 ساعة وبدرجــة حرارة 30م وبعد ذلك تمت عملية إزالة الوسط من الطبق وتصبيغ الطبق بأستعمال صبغة البلورات البنفسجية crystal violet وبتركيز 2 % ولمدة 30 دقيقة ثم غسلت الاطباق بعد ذلك بالماء المقطر. إنَ تصبغ منطقة الانتشار بصبغة البلورات البنفسجية وظهور مناطق للنمو حول منطقة الطعن يعد دليلاً على ايجابية الاختبار[23]

2- الكشف عن الحركــة Swarming:

استخدمت مستعمرة بكتيرية حديثة النمو منماة على الوسط المغذي الصلب لغرض اختبار هذا النوع من الحركة حيث تم تلقيح المستعمرة على وسط Swarming وبعد ان تركت الاطباق لتجف ليلة كاملــة، وتم التلقيح باستعمال اعواد اسنان خشبية Toothpick معقمة على ان يدخل داخل الوسط مع مراعاة عدم ملامسته لارضية الطبق ثم بعد ذلك تم حضن الاطباق بدرجة حرارة 30م ولمدة 24 ســاعة وملاحظة النتيجة من مكان الطعن حيث اصبح بشكل يشبه النجمة[24]

3- الكشف عن الحركة السابحة Swimming motality:

تم تلقيح مستعمرة بكتيرية حديثة النمو منماة على الوسط المغذي الصلب المطلوب اختبارها على وسط Swimming عن طريق أعواد أسنان خشبية Toothpick معقمة على ان يدخل داخل الوسط مع مراعاة عدم ملامسته لأرضية الطبق، ثم بعد ذلك تم حضن الاطباق بدرجة حرارة المختبر ولمدة 16 ســاعة وملاحظة النتيجة من مكان الطعن حيث اصبح بشكل يشبه الدائرة [25]

فحص الحساسية للمضادات الحياتية Antibiotic suscepitibility test:

اجري اختبار حساسية البكتريا لمضادات البيتالاكتام بالاعتماد على طريقة انتشار،وقد استخدمت المضادات الحيوية: Ceftazidime, Ciprofloxacin, Gentamicin, Imipenem, Pipercilln, Tobramycin

أ- حضر عالق البكتريا عن طريق اخذ مسحة من المستعمرة البكتيرية المطلوب إختبارها وهي مستعمرة حديثة النمو عمرها يتراوح بين 18 الى 24 ساعة منماة على الوسط المغذي الصلب وضعها في المحلول الملحي الفسلجي Normal saline، تم رج الانبوبة بواسطة جهاز

المازج وضبط التركيز اذ اصبح مساويا لمحلول ماكفرلاند 0.5 والذي يعادل 1.5×10^8 خلية/ مللتر.

ب- ثم نقل 100مايكروليترمن العالق البكتيري المحضر مسبقاً الى الوسط المغذي الصلب Nutrient agar ونُشِرَ على جميع الطبق بأستعمال مسحة قطنية Cotton swap معقمة وترك لمدة 10-15 دقيقة لكي يجف.

ت- تم توزيع اقراص المضادات الحيوية على الوسط بأستعمال الملقط المعقم والضغط عليها برقة بواقع 6 أقراص لكل طبق ثم وضعت الاطباق في الحاضنة لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37م.

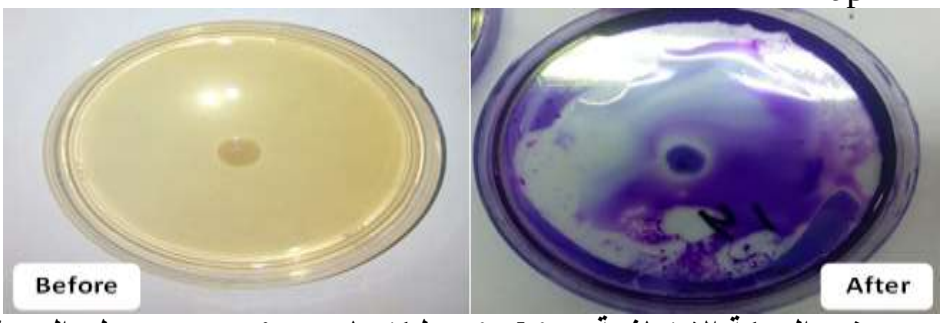
ث- قيست اقطار منطقة التثبيط بالمليلتر بأستعمال مسطرة. تم تفسير النتائج ومقارنتها اعتماداً على المواصفات القياسية المذكورة في CLSI (2019).

النتائج و المناقشة:

من عينات سريرية مختلفة للجروح تم الحصول على 25 عزلة تعود لبكتريا *P.aeruginosa*. شخصت العزلات البكتيرية النامية مبدئياً اعتماداً على صفاتها المظهرية عند تنميتها على وسط آكار الدم وأكار المكونكي في ظروف هوائية بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة ، فظهرت مستعمراتها صغيرة وشاحبة وكذلك تبين عند تنميتها على وسط الماكونكي بأنها غير مخمرة لسكر اللاكتوز أظهر الفحص المجهري للشرائح المصبوغة بملون كرام بشكل عصيات قضيبية bacilli سالبة لصبغة كَرام باللون الأحمر وهي متفقة مع ما وصفه Hashim وجماعته [15] وقد أجريت بعض الاختبارات الكيميائية الحيوية لمزيد من التحقق من الصحة. وعند دراسة عوامل الضراوة أبدت جميع العزلات نتيجة سالبة لإنزيم اللايبيز Lipase enzyme المحلل للدهون عدا 4 عزلات اعطت نتيجة موجبة من بين 25 عزلة أي بنسبة 16%. وظهرت جميع العزلات عدم القدرة على إنتاج ألإنزيم المحلل لليوريا عند زرعها على وسط اليوريا Urea Agar أي سالبة بنسبة 100%، إذ إنَه مع وجود اليوريا في الوسط فإن البكتريا سوف تقوم بإنتاج هذا الأنزيم للاستفادة منه في تحليل اليوريا إلى أمونيا والتي تعد كمصدر للنتروجين [16]. في حين كانت جميع العزلات البكتيرية محللة للجيلاتين أي إنها موجبة بنسبة 100% بسبب قدرة بكتريا *P. aeruginosa* على إنتاج أنزيم الجيلاتينيز. كذلك تبين عند دراسة انزيم البروتيز وبعد 48 ساعة من الحضن ظهر بأن16 عزلة منتجة للأنزيم أي بنسبة 64% يعتبر البروتيز أحد أهم عوامل الضراوة الذي يقوم بتحليل بروتينات الأنسجة مثل الإيلاستين elastin والكولاجين collagen، ويساعد البكتريا على غزو الأنسجة المصابة، خاصة في مرضى الحروق، ويعمل أيضاً على حماية البكتريا من دفاعات الجسم [17].في حين أظهرت جميع العزلات قابليتها على إنتاج السيدروفور وذلك بتغيرها إلى اللون الأحمر عند إضافتها إلى كلوريد الحديد الثلاثي $FeCl_3$ أي بنسبة 100%. أظهرت نتائج الكشف عن إنتاج الهيمولايسين hemolysin عند زراعة بكتريا *p.aeruginosa* على وسط الدم الصلب blood agar media قدرة العزلات البكتيرية على إنتاج بيتا هيمولايسين beta-hemolysis حيث كانت 6 عزلات قادرة على تحلل الدم أي بنسبة 24% إنَ الهيمولايسين يسبب تلف الأنسجة وإطلاق العناصر الغذائية host nutrients للمضيف مثل الحديد iron، حيث إنَ الحصول على الحديد يحسن من قدرة البكتريا على النمو والتكاثر داخل الخلية المضيفة host cell [17]، وكان شكل المستعمرات البكتيرية كبيرة ومسطحة وشاحبة اللون. إنَ عزلات *P.aeruginosa* تختلف في قدرتها على إنتاج

الهيمولايسين، ويرجع هذا التنوع إلى العديد من العوامل ومنها إختلاف مواقع جمع العينات، الرقم الهيدروجيني pH، درجة الحرارة، طبيعة العزلة البكتيرية وفترة الحضانة [18].

أظهرت جميع العزلات قابليتها على الحركة المقيدة الارتعاشية ولكن بدرجات وقوى مختلفة حيث كانت الحركة بعد التصبيغ بصبغة الكرستال البنفسجية crystal violet خارج منطقة الطعن واضحة وظاهرة فقد كانت الحركة في 3 عزلات منها قوية جداً لذلك تم ترميزها بالعلامة +++ أي بنسبة 12%؛ أما باقي العزلات وعددها 22 عزلة بكتيرية فقد كانت الحركة فيها متوسطة بحيث أعطت نتيجة ++؛ أي بنسبة 88%. ويمكن تفسير سبب حدوث هذه الحركة إلى امتلاك عزلات هذا النوع من البكتريا شعيرات تعرف بإسم شعيرات النوع الرابع Type IV pili والذي يرمز له T4P وتحديداً الصنف T4ap [26]



شكل 1: يوضح الحركة الارتعاشية twitching لبكتريا *P.aeruginosa* على الوسط قبل وبعد الغسل بصبغة الكريستال البنفسجية

أظهرت جميع العزلات قابليتها على الحركة Swarming عدا عزلة واحدة من هذا النوع 96%، وقد كانت بقوى ودرجات مختلفة حيث أظهرت 3 عزلات منها حركة جدا قوية أعطي لها الرمز +++ 12% في حين كانت 9 عزلات منها متوسطة في درجة حركتها وأعطي لها الرمز ++ للتعبير عن النتيجة أي إنها كانت بنسبة 36% أما الحركة في 12 عزلة المتبقية من العزلات المتحركة فقد كانت حركة بسيطة جداً تم ترميزها بالعلامة + وهي تمثل نسبة48%. الشكل (2) يوضح هذا النوع من الحركة.

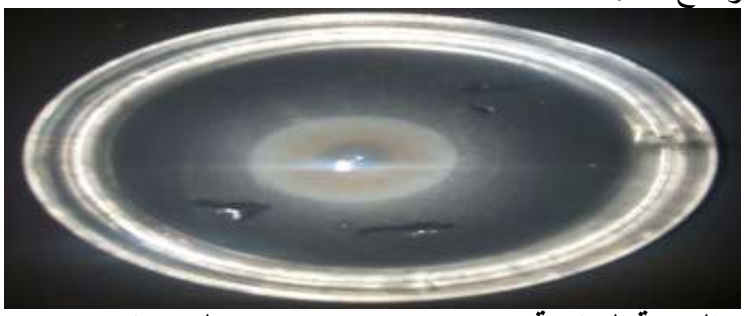
شكل2: حركة Swarming لعزلتين مختلفتين لبكتريا *P.aeruginosa* بدرجتين مختلفتين من القوة

جدول1:درجة الحركة من نوع Twitching وSwarming في عزلات بكتريا *P.aeruginosa*

رقم العزلـــة	Twitching motility	Swarming motility	رقم العزلـــة	Twitching motility	Swarming motility
P.a 1	++	++	P.a 14	+++	++

++	+++	P.a 15	+	++	P.a 2
+	++	P.a 16	+	++	P.a 3
+	++	P.a 17	+	++	P.a 4
+	++	P.a 18	+++	++	P.a 5
+	++	P.a 19	+	++	P.a 6
-	++	P.a 20	++	++	P.a 7
+	++	P.a 21	++	+++	P.a 8
++	++	P.a 22	+++	++	P.a 9
++	++	P.a 23	+	++	P.a 10
++	++	P.a 24	+	++	P.a 11
++	++	P.a 25	+	++	P.a 12
			+++	++	P.a 13

في حين أظهرت جميع العزلات البكتيرية قدرتها على الحركة الحركة السابحة وبأقطار مختلفة. الشكل رقم 3 يوضح ذلك.



شكل 3: يوضح الحركة السابحة Swimming motility لبكتريا *P.aeruginosa*

جدول2 : أقطار الحركة السابحة Swimming motility لبكتريا *P.aeruginosa*

رقم العزلـــة	قطر الحركـــة	رقم العزلـــة	قطر الحركـــة
P.a 1	10مليمتر	P.a 14	25مليمتر
P.a 2	7مليمتر	P.a 15	23مليمتر
P.a 3	10مليمتر	P.a 16	10مليمتر
P.a 4	12مليمتر	P.a 17	10مليمتر
P.a 5	13مليمتر	P.a 18	12مليمتر
P.a 6	36مليمتر	P.a 19	11مليمتر
P.a 7	7مليمتر	P.a 20	10مليمتر
P.a 8	10مليمتر	P.a 21	10مليمتر
P.a 9	30مليمتر	P.a 22	10مليمتر
P.a 10	10مليمتر	P.a 23	12مليمتر
P.a 11	9مليمتر	P.a 24	16مليمتر
P.a 12	12مليمتر	P.a 25	14مليمتر
P.a 13	15مليمتر		

في حين أظهرت نتائج إختبار حساسية عزلات بكتريا *P. aeruginosa* للمضادات الحيوية sensitivity to antibiotics تبايناً واضحاً وذلك نتيجة اختلاف العزلات واختلاف نوع المضادات التي استخدمت Ceftazidime Ciprofloxacin Gentamicin Imipenem Pipercilln Tobramycin، حيث كانت جميع العزلات مقاومة لمضاد Ceftazidime ذو تركيز 30مايكروغرام أي بنسبة 100% وهو من مجموعة السيفالسبورين الجيل الثالث التي لها حساسية ضد مدى واسع من الجراثيم السالبة لصبغة كَرام. وقد تكون هذه المقاومة العالية لـ *P. aeruginosa* لهذه المجموعة إما بسبب عدم نفاذية هذه المضادات الحيوية من خلال غشاء البلازما أو بسبب وجود إنزيمات β-lactamase طويلة المدى، والتي يتم التعبير عنها غالباً من خلال البلازميد. تحطّم هذه الإنزيمات حلقة بيتا لاكتام، وبالتالي تفقد قدرتها على الارتباط ببروتينات جدار الخلية أو ربما تعزى مقاومة *P. aeruginosa* للجيل الثالث من السيفالوسبورينات إلى إفراز إنزيم السيفالوسبوريناز الذي يتم التعبير عنه من خلال كروموسوم [18].

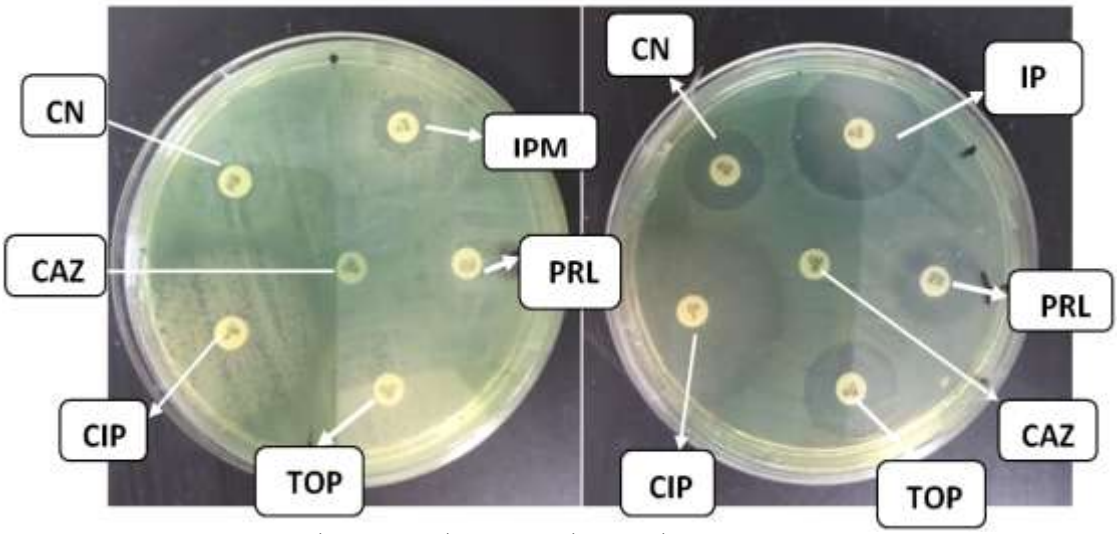
أما بالنسبة للمضاد سيبروفلوكساسين Ciprofloxacin ذو تركيز 5 مايكروغرام فهو من مجموعة الكينولونات Quinolines، وهو يعتبر فعّالًا ضد مجموعة كبيرة من الجراثيم، حيث أظهرت 11عزلة من عزلات بكتريا *P. aeruginosa* مقاومة لهذا المضاد أي بنسبة 44% في حين لوحظ حدوث تثبيط وقتل للبكتريا مع عودة مقاومة البكتريا للتثبيط مرة أخرى في 11 عزلة من مجموع العزلات؛ أي بنسبة 44% تعمل مجموعة مضادات الكيلونات على القيام بتثبيط عمل الحامض النووي DNA أما بالنسبة لمضاد تبرومايسين Tobramycin ذو تركيز 10 مايكروغرام هو مضاد حيوي ينتمي لمجموعة المضادات الحيوية من نوع الأمينوغلايكوسيدات Aminoglycosides أظهرت 13 عزلة منها مقاومة بكتريا *P. aeruginosa* بشكل كامل له أي بنسبة 52%، كما لوحظ حدوث تثبيط وقتل للبكتريا مع عودة مقاومة البكتريا للتثبيط مرة أخرى في 9 عزلات أي بنسبة 36%. إنَ المضاد الحيوي جنتامايسين Gentamicin ذو تركيز 10مايكروغرام هو أيضاً أحد المضادات العائدة لمجموعة الأمينوغلايكَوسيدات Aminoglycosides وقد أظهرت 13 عزلة من عزلات بكتريا *P. aeruginosa* مقاومتها لهذا المضاد بشكل كامل؛ أي بنسبة 52%؛ كما لوحظ حدوث تثبيط وقتل للبكتريا مع عودة مقاومة البكتريا للتثبيط مرة أخرى في 6عزلات؛ أي بنسبة24 % وتعتبر هذه المضادات الحيوية دواءاً رخيصاً ومتاحاً بسهولة وهي تستخدم على نطاق واسع في الممارسة العامة وفي المستشفيات وقد يكون هذا أيضاً من أسباب تطور مقاومة البكتريا ضد هذه الأدوية. ويعود سبب المقاومة في الأغلب لهذه المجموعة من المضادات إلى إفراز البكتريا للأنزيمات المحورة AMEs Aminoglycoside modifying enzymes وإنَ الجينات المشفرة لهذه الأنزيمات تكون محمولة على الكروموسوم أو على البلازميد أو عن طريق حدوث تغيير في نفاذية الغشاء ما يسبب عدم دخول المضاد إلى داخل الخلية [19].

إن المضاد ايميبنيم Imipenem 10مايكروغرام هو مضاد حيوي نصف اصطناعي من مجموعة كاربابينيم Carbapenem. أظهرت 20 عزلة من العزلات البكتيرية حساسيتها لهذا المضاد أي بنسبة 80% في حين لوحظ حدوث تثبيط وقتل للبكتريا مع عودة البكتريا للتثبيط مرة أخرى في 5 عزلات بكتيرية أي بنسبة 20% إن حساسية البكتريا لهذا المضاد أي مجموعة كاربابينيم هي نتيجة لعدم إنتاجها لإنزيمات البيتالاكتاميز المعدنية metallic β-lactemase، حيث تعمل هذه الانزيمات MβLs على تحليل مضادات هذه المجموعة [20]. تأثير المضاد بيبرسيلين Pipercilln على عزلات بكتريا *P.aeruginosa* حيث إنَه يتدخل في تركيب الجدار البكتيري البروتيني ويصنف ضمن مجموعة البيتالاكتام β -lactam، إضافة إلى ذلك فأنه يعمل على منع تكوين الجدار

الخلوي البكتيري. أظهرت 5 عزلات بكتيرية مقاومتها للمضاد أي بنسبة 20%، كما لوحظ حدوث تثبيط وقتل للبكتريا مع عودة المضاد لتثبيط البكتريا مرة أخرى في 7 عزلات وبنسبة 25% إنَ هذه المجموعة من المضادات يتم مقاومتها من قبل البكتريا عادةً عن طريق إنتاج الأنزيمات المحللة مثل بيتا لاكتميز β-lactamase نوع C وهذا الاختلاف بالنسب يرجع إلى اختلاف موقع عزل البكتريا. نلاحظ في هذه الدراسة إنَ بكتريا *P.aeruginosa* تزداد مقاومتها لمجموعة مضادات السيفالوسبورينات وذلك بسبب قدرة البكتريا على إنتاج أنزيمات البيتالاكتميز والتي تعمل على تحليل المضادات التي تكون محمولة على الكروموسومات أو البلازميدات أو بسبب عوامل الضراوة الكامنة فيها intrinsic أو المكتسبة جينياً بواسطة البلازميد acquired genetically by plasmid. إنَ الاستخدام الواسع والعشوائي للمضادات من قبل المرضى يعود إلى سهولة توفرها وتعاطيها وكذلك رخص ثمنها الأمر الذي أدى إلى ظهور سلالات متعددة المقاومة Multi -drug Resistance [21].

جدول 3: يوضح قيم نسب التثبيط للبكتريا *P.aeruginosa* بأستخدام المضادات

المضاد Antibiotics	الرمز Code	المقاومة Resistant		الحساسية Sensitive		متوسطة Intermediate	
		No.	%	No.	%	No.	%
Ceftazidime	CAZ	25	%100	0	%0	0	%0
Ciprofloxacin	CIP	11	%44	3	%12	11	%44
Tobramycin	TOP	13	%52	3	%12	9	%36
Gentamicin	CN	13	%52	6	%24	6	%24
Imipenem	IPM	0	%0	20	%80	5	%20
Pipercilln	PRL	5	%20	13	%52	7	%25



شكل 4 يبين المضادات الحيوية ودرجة الحساسية والمقاومة لعزلتين مختلفتين

الاستنتاجات:

اظهرت هذه الدراسة عدة إستنتاجات هي إن بكتريا الزائفة الزنجارية من المسببات المهمة لأخماج الجروح، وإن لها القابلية على مقاومة مضادات البيتالاكتام اضافة الى امتلاكها العديد من عوامل الضراوة وامتلاكها مقاومة عالية وبنسبة 100% للمضاد الحيوي من نوع Ceftazidime إنَ جميع عزلات بكتريا *P.aeruginosa* لديها القدرة على التحسس التام للمضاد Imipenem ما يعطي امكانية استعماله في علاج الامراض التي تسببها هذه البكتريا.

References:

1- Nagoba, B.S; Selkar, S.P; Wadher, B.J and Gandhi, R.C. 2013. Acetic Acid Treatment of Pseudomonal Wound Infections - A Review. Journal of Infection and Public Health. 6, Pp: 410-415.

2- Franzetti, Laura and Scarpellini, Mauro. 2007. Characterisation Of Pseudomonas Spp. Isolated From Foods. Annals Of Microbiology. 57 1, Pp: 39-47.

3- Verma, Poonam; Verma, Manish Kumar. 2018. Antimicrobial Activity Of Antibiotics And Antiseptics Dettol And Betadine Against Clinical Isolates Of Pseudomonas. Int. J. Life. Sci. Scienti. Res. Aeruginosa. Pp:1589-1598.

4- Todar, K. 2012. *Pseudomonas aeruginosa*. Todar's Online textbook of Bacteriology. University of Wisconsin- Madison Department of Bacteriology.

5- Prabhurajeshwar, C. 2019. A Review on Emergence of Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*; Its Risk Factors and Clinical Impacts. International Journal of Recent Scientific Research Vol. 10, Issue, 05F, Pp: 32502-32505.

6- Kolar, Milan; Sauer, Pavel; Faber, Edgar; Kohoutova, Jarmila; Stosová, Tatana; Sedlackova, Michaela; Chroma, Magdalena; Koukalova, Dagmar And Indrak, Karel. 2009. Prevalence and Spread of *Pseudomonas aeruginosa* And Klebsiella Pneumoniae Strains in Patients with Hematological Malignancies. New Microbiologica, 32, Pp: 67-76

7- Harper, David R; Parracho, Helena M. R. T; Walker, James; Sharp, Richard; Hughes, Gavin; Werthé, Maria; Lehman, Susan And Morales, Sandra. 2014. Bacteriophages and Biofilms. Antibiotics. 3, Pp: 270-284.

8- Persson, Astrid E. 2010. Study of *Pseudomonas aeruginosa* And Different Wound Dressing Products. Thesis of Master. Department Of Chemical And Biological Engineering

9- Macin, Salih and Akyon, Yakut. 2017. Phenotypic and Genotypic Virulence Factors in *Pseudomonas aeruginosa* Strains according To Pigment Presence. Acta Medica Mediterranea. 33, Pp: 1033- 1038.

10- Espinosa, Rosario Morales; Cha´Vez, Gloria Sobero´ N; Sapie´N, Gabriela Delgado; Miranda, Luisa Sandner; Me´Ndez, Jose´ L; Valencia, Gerardo Gonza´ Lez And Cravioto, Alejandro. 2012. Genetic and Phenotypic Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* Population with High Frequency of Genomic Islands. Plos One. Vol 7, Issue 5.
11- Dheyab, Ali S; Aljumaili, Omar I. And Hussein, Najeeb M. 2018. Study Of Virulence Factors In Urease-Positive Bacteria Isolated From Urinary Tract Infections Clinical Specimens Journal Of Pure And Applied Microbiology , Vol. 123, Pp: 1465-1472.
12- Branson D. "Methods in clinical bacteriology manual of tests and procedures". Springfield. Illinois. USA. 1972.
13- Sujatha, N; Ammani K. 2013. Siderophore Production by The Isolates Of Fluorescent *Pseudomonads*,Int J cur res rev,oct.vol 05 20
14- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. 2019. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing; Twenty- SIX informational supplement.
15- Hashim, Intisar A; Wdaah, Qasim H and Atya, Ahmed A. 2019. Potential Effect of Antimicrobial Agents against Staphylococcus Aureus and *Pseudomonas aeruginosa* Strains From Patients With Skin Infections. University Of Thi-Qar Journal Of Science Utsci, Vol 7, NO 1, Pp: 7- 14.
16- Varghese, Naveena; Joy, P.P. 2014. Microbiology Laboratory Manual. Https://Www.Researchgate.Net/Publication /306018042
17- Lahig, Hassan F; Hassan, Muthanna H and Yassir, Luma A. 2017. Molecular Detection of *Pseudomonas aeruginosa* And Study the Effect of Fresh Garlic Juice on Some Virulence Factors of This Bacteria.J.of university of anbar for pure science: vol.11,no.2,pp:9-17.
18- AL-Dossary, Othman Ahmed Ismael. 2018. *Pseudomonas aeruginosa*: Molecular and Bacteriological Study of Some Virulence Factors and Antibiotic Susceptibility to Volatile Oils. Thesis of Master. College Of Science. University Of Anbar.
19- Cox, Georgina; Stogios, Peter J; Savchenko, Alexei And Wright, Gerard D. 2019. Structural And Molecular Basis For Resistance To Aminoglycoside Antibiotics By The Adenylyltransferase Ant2-Ia. Mbio.Asm.Org. Vol 6, Issue 1.
20- Bush, Karen and Jacoby, George A. 2010. Updated Functional Classification Of -Lactamases. Antimicrobial Agents And Chemotherapy. Vol.54, No. 3, Pp: 969-976.

21- Alnour, Tarig Ms and Abakur, Eltayib Hassan Ahmed. 2017. Multidrug Resistant *Pseudomonas* P *aeruginosa*: Medical Impact، Pathogenicity, Resistance Mechanisms and Epidemiology. Jsm Microbiology 53: 1046.
22- Tariq, H; Z, Ahmed, Ma, Awan; A, Samad and S, Muhammad. 2017. Isolation, Identification and Antibiogram of *Pseudomonas aeruginosa* From Nosocomial Wound Infection In Quetta District. International Journal Of Biology, Pharmacy And Allied Sciences Ijbpas, Ijbpas, June, 66, Pp: 1220-1235.
23- Rashid, M. Harunur And Kornberg, Arthur. 2000. Inorganic Polyphosphate Is Needed for Swimming, Swarming, And Twitching Motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. Pnas, April 25, Vol. 97, No. 9, Pp: 4885–4890.
24- Mohammed, Manal Khalid. 2011. Initiation of Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa* Serotype and Pseudomonas Oryzihabitans Correlates with Emergence of Hyperpiliated and Highly Adherent in Swimming, Swarming, And Twitching Motilities. Al- Mustansiriyah J. Sci. Vol. 22, No 7.
25- Latif, Ibraheem A. 2015. Swarming Motility Patterns Of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Otitis Media. Tikrit Journal of Pure Science 20 4, PP: 26-29.
26- Leighton, Tiffany L.; Buensuceso, Ryan N. C; Howell, P. Lynne and Burrows, Lori L. 2015. Biogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* Type IV Pili and Regulation of Their Function. Environmental Microbiology. 1711, PP: 4148–4163.

Detection of some virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from wound infections and the effect of some antibiotics on them

Sura S. Hasan
Researcher
Asmaa E. Al-Niaame
Assist. Lecturer
Collage of Basic Education
Al- Mustansiryah University
biologistsura@yahoo.com
drasezzat@yahoo.com

Abstract:

A total of 126 samples of clinical injuries were collected from various hospitals in the Iraqi capital Baghdad. For the diagnosis of *P.aeruginosa* isolates, the isolates were cultured on agricultural media, MacConkey agar and solid cetrimide agar. Biochemical tests were carried out ant it was appeared that 25 isolates were *P.aeruginosa*, which represent 19.48% of total number of isolates. Four bacterial isolates showed a capability of producing lipase enzyme 16%, while all isolates were unable to produce urease, whereas all bacterial isolates showed the ability to degrade gelatinase 100%, and 16 isolates were able to produce Protease 64%.In the process of detecting the susceptibility of bacterial isolates to the production of Siderophore, it was found that all isolates are capable of producing it 100%. Concerning the capability of producing Hemolysin, it appeared that only 24% of isolates produced it when grown on solid blood medium, the rest of the isolates were unable to produce it. All the bacterial isolates that had been studied showed ability for the Twitching motility and Swimming Motility that means a rate of 100%, while 24 isolates except one isolate only from total number of isolates were uncapable of Bacterial Swarming 96%. The isolates sensitivity of 6 antibiotics was tested using Disk Diffusion Method. The results showed that all bacterial isolates were resistant to Ceftazidime 100%, whereas only 11 isolates were resistant to antibiotics Ciprofloxacin 44%,13 isolates showed resistance to each type of the antibiotics Tobramycin and Gentamicin that equals a rate of 52%, while no bacterial isolates had been able to resist The antibiotic Imipenem, and for the antibioticGentamicinonly5bacterial isolates were able to resist it 20%.

Keywords:*Pseudomonas aeruginosa*, wound, antibiotics, Biochemical, resistance, virulence factors