دراسة صفة تعدد المقاومة للمضادات الحياتية لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من أخماج الحروق والجروح المشخصة باستعمال جهاز الفايتك Vitek2compact

أ. د. منيرة جلوب إسماعيل العبادي
جامعة بغداد/ وحدة بحوث المناطق الحارة
أ. م. د. ضمياء محمود ابراهيم
عُلا عبد الكريم كاظم النعيمي
الجامعة المستنصرية / كلية التربية الأساسية

الخلاصة :

أجريت هذه الدراسة في مختبر البكتريولوجي / مستشفى الكندي التعليمي لغرض تشخيص بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من أخماج الجروح والحروق و اختبار حساسية العزلات للمضادات الحياتية للكشف عن صفة تعدد المقاومة للمضادات الحياتية باستخدام جهاز Vitek2compact تم الحصول على العزلات من المستشفيات التالية: مستشفى الحروق / مدينة الطب واليرموك و الكندي التعليمي للفترة ما بين تشرين الثاني /2013 ولغاية شباط /2014 ،شخصت 31 عزلة من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* بواقع 9 عزلات 45% من حالات التهاب الجروح ، 22 عزلة 78.57 % من التهابات الحروق إذ زرعت العينات على الأوساط الزرعية التفريقية والاختيارية لغرض العزل. ثم أخضعت المزارع ألبكتيرية النامية إلى الاختبارات المجهرية ، و المظهرية و الكيموحيوية ولتأكيد النتائج استعمل نظام (GN I Card) باستعمال جهاز Vitek 2 ' كما اختبرت حساسية بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* ضد 16 مضاداً حيوياً باستعمال بطاقات الـ(AST Card) بنظام Vitek2compact وقد تبين أن العزلات تحمل صفة المقاومة المتعددة للمضادات (Multi drug resistance) ، إذ أظهرت جميع العزلات مقاومة بنسبة 100% للمضادات البيبراسيلين Piperacillin، التيكارسلين Ticarcillin التيكارسلين كلافولانيك أسيد Ticarcillin clavoulanic acid ، السيفازولين Cefazolin

،السفترياز ون Ceftriaxone وتيجَسيكلين Tigecycline ثم تدرجت مقاومة البكتريا لبقية المضادات ، في حين كانت حساسة بنسبة 50% لمضاد السيفتازيدم Ceftazidime ،تم تحديد التراكيز المثبطة الدنيا (MICs) لعزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* باستعمال نظام Vitek2compact و حددت النتائج بوصف البكتريا مقاومة R أو حساسة S .

الكلمات ألمفتاحية : *Pseudomonas aeruginosa* ، Vitek2compact ،MIC ، صفة تعدد المقاومة للمضادات الحياتية ، الجروح والحروق .

المقدمة:

تعد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* بكتريا واسعة الانتشار ، إذ تتواجد في التربة و المياه و على الفواكه و الخضر . و تتواجد على سطح جلد الإنسان و الحيوان و على سطح النباتات (Kharazmi ،1991) ،أما في بيئة المستشفيات فقد وجد أن بكتريا *P.aeruginosa* توجد في نواقل متعددة مثل المطهرات ،المعدات التقنية ،الغذاء ،الحنفيات ،المغاسل ،أرضية المستشفيات وأكثر من ذلك فأنها تدخل مرة أخرى إلى بيئة المستشفيات عن طريق الفواكه ،الخضروات والمرضى الذين ينقلون إلى المستشفى ،إذ أنها تسبب من 10-20% للأخماج المكتسبة من المستشفى (Nosocomial infection) ،أو الإمراض الحاصلة بعد العمليات الجراحية أو في وحدة العناية المركزة Intensive care units (ICUs) (Pitt وآخرون ،2003) ،إذ وجد أن بكتريا *P. aeruginosa* سبباً رئيساً لاخماج الحروق التي أودت بحياة الكثير من مرضى الحروق نتيجة تسمم الدم Septicemia(Rastegar وآخرون ،2005) ،إن تواجد هذه البكتريا على سطح الجلد يجعلها سهلة الاختراق عبر الجلد و مسببة للعديد من الالتهابات للجروح Wound infection و الحروق Burn infection تعد بكتريا *P. aeruginosa* من اكبر أنواع البكتريا السالبة لصبغة كرام مسببة للإمراض في تاريخ البشرية لأنها تمتلك العديد من عوامل الضراوة التي لها أثراً في أمراضيتها ،منها المقترن بالخلية كالاسواط (Flagellam) والأهداب من نوع (Pilli IV) التي تستخدمها في عملية الالتصاق على الخلايا الظهارية والاستيطان ومن ثم تكوين الغشاء الحيوي Biofilm في موضع الإصابة ، بعد ان تتجمع بأعداد كبيرة ، والغشاء الحيوي يحميها من دفاعات الجسم

و يزيد مقاومتها للمضادات الحيوية (Zubair و آخرون ،2011) كذلك تمتلك عوامل ضراوة خارج الخلوية extracellular virulence factors منها الإنزيمات المحللة للبروتين Protease و الأنزيم المحلل للدم hemolysins وأنزيم Phospholipases والسموم المفرزة خارج خلوية (Ong وآخرون ،2006) . إن استعمال المضادات الحيوية بشكل واسع في علاج هذه البكتريا أدى إلى إحداث المقاومة للمضادات الحيوية . إن امتلاك هذه البكتريا للبلازميدات جعل منها أكثر مقاومة بسبب جينات المقاومة المحمولة على البلازميدات و إن هذه الجينات تسبب في حصول و تطور مقاومة للمضادات الحيوية فضلاً عن حصول المقاومة المشتركة للمضادات الحيوية (Baldwin وآخرون ،2008)، كما معروف غالباً تحوي معظم سلالات بكتريا *P. aeruginosa* متعددة المقاومة على بلازميد المقاومة (R-plasmid) والذي قد يحمل صفة المقاومة لواحد أو أكثر من العقاقير العلاجية (Levy ،2002) ، إن حدوث الطفرات الوراثية في الجينات يؤدي إلى حصول تطور سريع في مقاومة بكتريا *P. aeruginosa* للمضادات الحيوية و خلال مدة قصيرة من استعمال هذه المضادات في العلاج ،هذا النوع من المقاومة خطير جدا بسبب تطور المقاومة أثناء العلاج ،مما قد يسبب فشلاً في علاج إصابات هذه البكتريا،لهذا اصبح من الضروري تشخيص العزلات خلال وقت قياسي دون حدوث أية طفرات في العزلات وبدقة عالية وبنسبة خطأ قليلة جدا اضافة لأختبار مقاومة العزلات المدروسة والتركيز المثبط الأدنى MIC للمضادات الحيوية باستعمال جهاز الفايتك Vitek2compact ليتم تحديد فعالية المضادات الحيوية فضلا عن التقليل من الاستخدام العشوائي لها والذي يعد احد الأسباب المهمة في ظهور المقاومة في البكتريا (Carmeliوآخرون ،1999) ،إذ أكد ملا خليل (2012) إن تشخيص العزلات البكتيرية بواسطة جهاز الفايتك يؤكد نتائج التشخيص الأولي وبنسبة عالية تصل إلى (98 %) حيث استعمل جهاز الفايتك في تشخيص البكتريا المعزولة من أخماج الحروق والجروح .

المواد وطرق العمل:-

جمع العينات :- جمعت 70 عينة (مسحة swabs) من المرضى الراقدين الذين يعانون من التهاب الحروق و الجروح وتحت الإشراف الطبي المختص من المستشفيات التالية : مستشفى الحروق /مدينة الطب واليرموك والكندي في بغداد للفترة ما بين تشرين الثاني

2013/ ولغاية شباط /2014 وزرعت على الأوساط المغذية (أكار الدم ، أكار الماكونكي، اكار الستريمايد) لغرض العزل و التشخيص الأولي لبكتريا *P. aeruginosa* وفق (Collee واخرون ، 1996).

عزل وتنقية بكتريا *P. aeruginosa* :- زرعت العينات على وسط اكار الدم و الماكونكي وحضنت الإطباق عند درجة حرارة (37م˚) لمدة 24 ساعة وأعيد زرعها على وسط اكار الستريمايد بوصفه وسط اختياري خاص ببكتريا *P. aeruginosa* للحصول على عزلات نقية حيث حضنت عند درجة حرارة (37 م˚) لمدة 24 ساعة ، (Hawkeye و Lewis،1989) .

تشخيص بكتريا *P. aeruginosa* :- تمت الفحوصات الآتية وكما وردت في (Baron وآخرون ،1994؛ Holt وآخرون، 1994) وكالأتي:-

1- الفحوصات المظهرية :- تم دراسة الصفات المظهرية للمستعمرات البكتيرية المعزولة على وسطي اكار الماكونكي و اكار الستريمايد من حيث شكل المستعمرات ولونها وحجمها وقابليتها على تخمير سكر اللاكتوز ،وإنتاجها لصبغة البايوسين الخضراء والرائحة ، وإنتاجها لإنزيمات الـ Hemolysin على وسط اكار الدم .

2- الفحوصات المجهرية :- تمت بأجراء التصبيغ بملون كرام للعزات . وفحصها بالمجهر الضوئي تحت قوة تكبير العدسة الزيتية لغرض دراسة شكل وترتيب الخلايا وتجمعها وتفاعلها بملون كرام Gram's Stain .

3- الفحوصات البايوكيميائية :- لغرض التشخيص التأكيدي لعزلات بكتريا *P. aeruginosa* استعمل الفحوصات البايوكيميائية الآتية (Baron و Fingold ،1990؛ Holt وآخرون، 1994 ؛ Atlase وآخرون ، 1995؛ Brooks وآخرون ،2001) وشملت :

- **اختبار إنتاج إنزيم الاوكسيديز Oxidase test :**

نقل جزء من المزروع البكتيري لكل عزلة النامي على وسط الاكار المغذي بعمر (24-18) ساعة بوساطة العيدان الخشبية المعقمة wood sticks إلى ورقة ترشيح ووضع فوقها قطرتان من كاشف الاوكسديز (N,N,N,N Tetramethyl –p- phenylene

(diamin dihydrochloride ، وكانت النتيجة الموجبة هي تحول لون المستعمرة إلى البنفسجي خلال 10 ثوانٍ .

- **إنتاج إنزيم الكاتاليز Catalase test :**

نقل جزء من المزروع البكتيري لكل عزلة بعمر (18-24) ساعة من وسط الاكار المغذي إلى شريحة زجاجية نظيفة وجافة ووضع فوقها قطرة من 3 % بيروكسيد الهيدروجين وكانت النتيجة الموجبة هي ظهور فقاعات هوائية على سطح الشريحة دلالة على أنتاج إنزيم الكاتاليز وتحرر غاز الأوكسجين .

- **النمو بدرجتي حرارة (4 م° و 42 م°) :**

زرعت العزلات البكتيرية بطريقة التخطيط على وسط الاكار المغذي وحضنت بدرجة حرارة 42 م° ومزروع أخر بدرجة 4 م° لمدة (24–48) ساعة ، ويعد وجود النمو دليل على ايجابية الفحص .

- **فحص استهلاك السترات Citrate utilization test :**

تم الكشف عن استهلاك السترات كمصدر وحيد للكاربون بتنمية إلعزلات البكتيرية في وسط Simmon citrate agar حيث لقحت أنابيب الوسط بالمزروع البكتيري لكل عزلة بعمر (18-24) ساعة وحضنت بدرجة حرارة 37م لمدة (24-48) ساعة. أن تحول الوسط من الأخضر الى الأزرق دلالة على النتيجة الموجبة ووجود النمو.

تأكيد التشخيص واختبار حساسية العزلات للمضادات الحيوية بنظام الفايتك Vitek2 compact System:

استخدم جهاز Vitek2 compact System في تأكيد تشخيص عزلات بكتريا P. aeruginosa واختبار حساسيتها للمضادات الحيوية وفق لـ(Baily و Scotts؛2014) من خلال عدد تشخيصية خاصة بالجهاز حيث تحتاج كل عزلة عدتان احدهما البطاقة الخاصة بتشخيص البكتريا السالبة لملون كرام (GN ID Card) (Gram negative identification card) والأخرى خاصة بفحص الحساسية للمضادات الحياتية (AST Card) (Antibiotic sensitivity test card) والتي تضمنت المضادات الحياتية بالاعتماد على المواصفة (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2013: CLSI) و مواصفة مختبر الصحة العامة المركزي (Central Public CPHL)

(Health Laboratory: 2014) ، تحتوي بطاقة التشخيص على 64 حفرة يوجد فيها وسط مجفف ودليل لوني تجري فيه الاختبارات الكيموحيوية ويسجل الجهاز التغيرات اللونية الحاصلة نتيجة لنمو البكتريا ، وتحتوي بطاقة اختبار الحساسية للمضادات الحياتية على 20 18- مضاد حيوي موزع على 64 حفرة بحيث يكون لكل مضاد أكثر من تركيز ملحق ويسجل الجهاز التغيرات الحاصلة في العكورة بعد نمو البكتريا .

- **المواد المستعملة :-**

a) محلول ملحي معقم Normal saline (0.5 %).
b) أوساط زرعية (وسط الماكونكي ووسط الاكار المغذي) .
c) قطعة بلاستيكية تسمى(Polystyrene) لغرض حمل الأنابيب .
d) بطاقات التشخيص الخاصة بالبكتريا السالبة لملون كرام VITEK2 GN Card .
e) بطاقات اختبار الحساسية للمضادات الحياتية VITEK2 AST Card .
f) جهاز قياس العكورة VITEK2 Densichek .
g) مازج Vortex .
h) مسحة معقمة Swab .

- **طريقة العمل :-**

a) تمت تنميت العزلات قيد الدراسة بطريقة التخطيط على وسط الماكونكي أو الاكار المغذي وحضنت مدة 24 ساعة وبدرجة 37 م°.
b) أخذت أنبوبتين من الـ Kan tube احدهما لغرض التشخيص والأخرى لفحص الحساسية ووضع في كل واحد ة منها 3 مليلتر من محلول ملحي معقم Normal saline ثم أخذ بواسطة الناقل Loop من مستعمرة منفردة و وضعت فيKan tube لعمل عالق للأنابيب الخاصة بالتشخيص ثم قيست عكورتهُ بواسطة جهاز VITEK2 Densichekبحيث تكون عكورة العالق مساوية إلى (0.63 – 0.05) ثم نقل 145 مايكروليتر من العالق من أنابيب التشخيص إلى أنابيب فحص الحساسية بواسطة ماصة دقيقة.

c) غمر الأنبوب الناقل Card transfer tube unit المتصل بالبطاقة (GN Card و AST Card) في أنبوبة الاختبار Kan tube وثبتت على حامل خاص لغرض إدخالها داخل الجهاز.

d) بعد أن حضرة العينة تم إدخالها إلى باب الملأ ليتم انتقال العينة من Kan tube إلى البطاقة بعدها يتم نقل العينات يدويا إلى باب التحميل ليتم الحضن بدرجة حرارة 37 م^{o} وتعطى النتائج بين 4 - 6 ساعات بالنسبة للتشخيص و6 - 12ساعة بالنسبة لاختبار الحساسية للمضادات الحيوية .

e) طبع تقرير التشخيص وتقرير اختبار الحساسية للمضادات الحيوية لكل بطاقة موجودة داخل Incubator وبحسب تعليمات شركة BioMerieux .

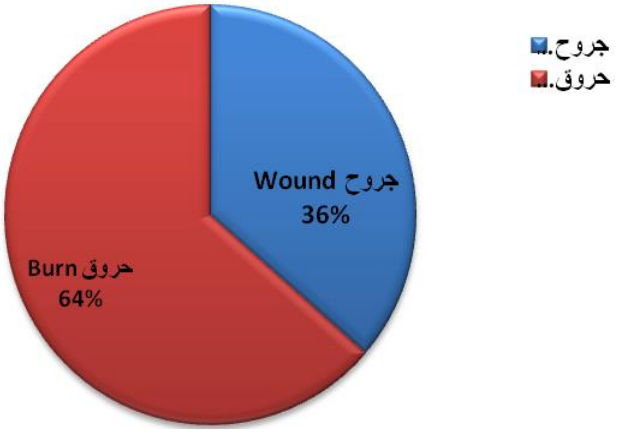
النتائج والمناقشة:-

شملت الدراسة جمع (70) مسحة من إصابات الحروق والجروح من كلا الجنسين (الذكور والإناث) والتي تراوحت أعمارهم ما بين (1- 63 سنة) وللمدة من (تشرين الثاني 2013/ ولغاية شباط /2014)من المستشفيات التالية : مدينة الطب / مستشفى الحروق واليرموك التعليمي والكندي التعليمي في بغداد ، وبينت نتائج العزل الأولي أن 48 عينة أظهرت نتيجة موجبة للزرع البكتيري وبنسبة 68.57% ، فيما كانت 22 عينة سالبة للزرع البكتيري بنسبة 31.42 % ، بلغ عدد عزلات بكتريا *P. aeruginosa* المأخوذة من أخماج الجروح والحروق 31 عزلة وبنسبة64.5% من مجموع العينات الموجبة للزرع البكتيري ،توزعت الأنواع البكتيرية المعزولة وحسب مصادر عزلها ووفقاً لنتائج الاختبارات المظهرية و الكيموحيوية الأولية ونتائج التشخيص التأكيدي بجهاز Vitek 2 كما موضح في الجدول (4-1) ، ويتضح من النتائج أن أعلى نسبة للعزل لبكتريا *P. aeruginosa* كانت 78.57% من التهابات الحروق مما يدل على أن المسبب الرئيسي لاخماج الحروق هي بكتريا*P. aeruginosa* ، تعد هذه البكتريا من الممرضات ألانتهازيه ألملوثه أذا أنها تنتهز فرصة حدوث اختلال عام أو موضعي في أحد دفاعات الجسم كي تخترقها وتغزو هذه المناطقويعتبر عامل قلة النظافة ألعامه للمريض والملامسين له والكادر الطبي العامل في المستشفيات وتلوث أجواء المستشفيات والأدوات والأسرة سببا لانتشارها فضلاً عن كونها مقاومه للعديد من المعقمات والمطهرات التي تستخدم في التنظيف والتعقيم داخل

المستشفيات بالإضافة إلى مقاومتها للعديد من المضادات الحيوية .أجريت عدة دراسات محلية و عالمية حول إصابات الجروح والحروق ببكتريا *P.aeruginosa* ونتائج هذه الدراسة تتوافق مع نتائج دراسة ألخالصي (2014) ،إذ وجد أن بكتريا *P.aeruginosa* كانت هي الأكثر عزلا في عينات أخماج الحروق والجروح المأخوذة من مستشفيات بغداد وكانت بنسبة 76% ، كذلك أكدت نتائج دراسة كل من (Pruittوآخرون ،2001) و (Closky وآخرون ،1998)التي أجريت في الولايات المتحدة أن أعلى نسبة عزل كانت لبكتريا *P.aeruginosa* من أخماج الحروق و الجروح هي 51.2% و 42.6% على التوالي .أن اختلاف نسب العزل لبكتريا*P.aeruginosa* وأنواعها في الدراسات المحلية والعالمية قد يعود إلى عدة أسباب منها اختلاف مواسم جمع العينات و أوقات العزل و مصدر العزلة و اختلاف الموقع الجغرافي للعزل وعدد العينات ، وغيرها من العوامل المؤثرة ، فضلا" عن العامل الأهم وهو المضادات الحيوية وسوء استعمالها سواء كان تعاطي المريض للعقاقير التي تمنع نمو البكتريا أو تلك التي تقاومها البكتريا فتنمو ، مما ساهم بشكل كبير بانتشارها.

الجدول (4-1)النسبة المئوية بكتريا *P.aeruginosa* المعزولة من أخماج الحروق والجروح

نوع العينة	عدد العينات الموجبة	عدد عزلات *P.aeruginosa*	النسبة المئوية
جروح Wound	20	9	%45
حروق Burn	28	22	%78.57
المجموع	**48**	**31**	**%68.58**
قيمة مربع كآي (χ^2)	--	--	**8.217 ****
** (P≤0.01).			



الشكل (4-1) النسبة المئوية لبكتريا P.aeruginosa المعزولة من أخماج الحروق والجروح

تشخيص العزلات Isolates of Identification

التشخيص المظهري Morphological و الكيموحيويةBiochemical

شخصت العزلات التي عزلت من الجروح والحروق اعتمادا على الصفات الزرعية والمظهرية الكيموحيوية بزراعتها على وسط أكار الدم و على وسط أكار الماكونكي و على الوسط الانتقائي السترمايد الخاص ببكتريا*P.aeruginosa* في ظروف هوائية بدرجة حرارة 37مْ ولمدة 24 ساعة ، وقد اعتمدت بعض الصفات التشخيصية المهمة في عملية التشخيص الأولي ، إذ تم انتقاء المستعمرات شاحبة اللونغير مخمرة لسكر اللاكتوز الموجود في الوسط وذات رائحة شبيهه برائحة العنب المتخمر على وسط الماكونكي الصلب و ذات لون غامق محاط أغلبها بهالة شفافة على وسط أكار الدم دليل على تحليل الدم وإنتاج الهيمولايسين أما على وسط السترمايد كانت أغلب العزلات منتجة لصبغة البايوسيانين الزرقاء كما في (شكل4-2).

أظهرت نتائج التشخيص بأنها خلايا عصوية سالبة لملون غرام ، غير مكونة للسبورات بالفحص ألمجهري للشريحة الزجاجية المحضرة من المستعمرات المفردة المصبوغة بصبغة كرام وهذا يتوافق مع المواصفات المذكورة في (Al-Dahmoshi, 2013) .

أما في الفحوصات الكيموحيويه فقد أبدت جميع العزلات نتائج موجبة لفحص الاوكسيديز Oxidase testو Catalase test و استهلاك السترات، كما استطاعت جميع العزلات النمو في درجات حرارة42 مْ و كما في الجدول (4-2).

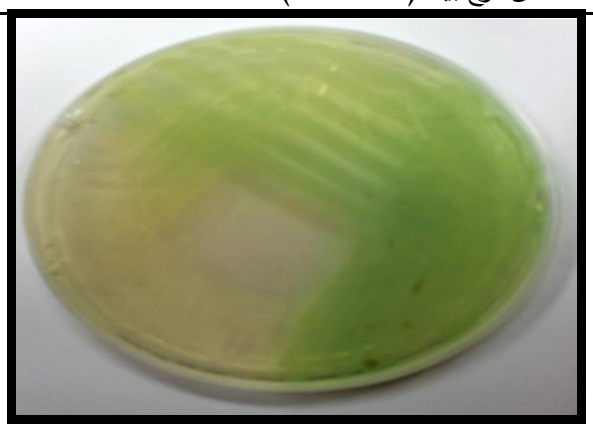
الجدول (4-2)الفحوصات المظهرية و الكيموحيوية لعزلات بكتريا *P. aeruginosa*

الاختبار	النتيجة
استجابة الخلايا لملون إكرام	-
أنتاج أنزيم الاوكسيديز	+
أنتاج أنزيم الكاتاليز	+
النمو على وسط الماكونكي الصلب	+
النمو على وسط السترمايد الصلب	+
تحلل كريات الدم الحمر	+ β-haemolysis
فحص استهلاك السترات	+
النمو بدرجة حرارة 42°م	+

(+) فحص موجب

(-) فحص سالب

(+ β-haemolysis) تحلل من نوع بيتا (تحلل كامل)



الشكل (4-2) نمو بكتريا *P. aeruginosa* على وسط السترمايد الصلب

تشخيص بكتريا *P. aeruginosa* باستعمال جهاز الفايتك Vitek 2 Compact System

أجري التشخيص التأكيدي للعزلات العائدة لبكتريا (*P. aeruginosa*20 عزلة) والمعزولة من إصابات الحروق و الجروح التي شملتها الدراسة باستعمال البطاقة السالبة (GN ID Card) والخاصة بجهاز Vitek Compact 2 وقد جاءت نتائج هذا الفحص مطابقة لنتائج الفحوصات الكيموحيوية ، إن استعمال البطاقة الخاصة بالبكتريا السالبة لصبغة كرام يعطي دقة من خلال إجراء 64 اختبارا" وخلال 5-8 ساعات ،فضلا عن احتوائه اختبارات غير تقليدية لا توجد في معدات التشخيص الأخرى مثل عدة الـ Api،

مما يتيح تشخيص العزلات خلال وقت قياسي دون حدوث أية طفرات في العزلات وبدقة عالية وبنسبة خطأ قليلة جدا ، إذ يظهر الجهاز نتائج العزلات الضعيفة تجاه تفاعل معين ويرمز لها بالرمز (-) دليلاً على التفاعل السالب والرمز (+) يعد دليلا على التفاعل الموجب، وتحوي برمجيات الجهاز على قواعد بيانات خاصة تقوم بتحويل نسق أيض البكتريا تحت الاختبار إلى عدد حيوي Bionumber مكون من15 رقما"، حيث تعمل الحاسبة المرتبطة بجهاز Vitek 2 على مقارنة معطية التشخيص السريع خلال مده أقصاها ثماني ساعات، وأظهرت نتائج هذا الاختبار ان 20 عزلة من عزلات البكتريا التي اختبرت أكدت عائديتها إلى بكتريا *P. aeruginosa* وعزلة واحدة فقط شخصت بأنها من نوع *P. pseudoalcaligenes* .اذ أكد ملا خليل (2012) إن تشخيص العزلات البكتيرية بواسطة جهاز الفايتك يؤكد نتائج التشخيص الأولي وبنسبة عالية تصل إلى (98 %) حيث استعمل جهاز الفايتك في تشخيص البكتريا المعزولة من أخماج الحروق والجروح .

اختبار مقاومة العزلات المدروسة والتركيز المثبط الأدنى MIC للمضادات الحيوية باستعمال جهاز الفايتك :

فحص الحساسية مهم في تحديد فعالية المضادات الحيوية فضلا عن التقليل من الاستخدام العشوائي لها والذي يعد احد الأسباب المهمة في ظهور المقاومة في البكتريا (Carmeli وآخرون،1999) ،إذ تم اختبار حساسية 20 عزلة لبكتريا *P. aeruginosa* والمعزولة من إصابات الحروق و الجروح التي شملتها الدراسة و حدد الـ MIC لـ 16 مضاد حيويكفحص تكميلي لفحص الحساسية باستعمال بطاقة فحص الحساسية للمضادات الحياتية (AST Card) والخاصة بجهاز Vitek Compact 2 ،وصنفت العزلات مقاومة أذا كان MIC أعلى من نقطة التوقف للتركيز المثبط الأدنى Break point MIC المعرفة بواسطة (CLSI، 2013 ؛ CPHL ، 2014).

أظهرت العزلات قيد الدراسة مقاومة للمضادات البيبراسيلين Piperacillin، التيكارسلين Ticarcillin و التيكارسلين كلافولانيك أسيد Ticarcillin clavoulanic acid بنسبة (100%)وكان الـ MIC(128) ومقاومة بنفس النسبة للسيفازولين Cefazolin و السفتريازون Ceftriaxone بينما كان الـMIC(64)، (16- 64) على التوالي في حين كانت المقاومة للمضاد Piperacillin Tazobactam بنسبة (80%) و الـ MIC تراوح

ما بين (4-128)وكانت المقاومة للمضادات الاميكاسين Amikacin، الجنتامايسين Gentamycin و التوبرامايسين Tobramycin بنسبة (65% ,80% ,85%) على التوالي وقيمة الـ MIC تراوحت بين (2 -64)[، (1 -16)،](1- 16) على التوالي كما أبدت العزلات مقاومة متساوية للمضادين الاميبنيمImipenemو الميروبنيم Meropenemبنسبة (70%) و بقيمة MIC تراوحت بين (0.25 -16) و (1 -16) على التوالي ، قاومت العزلات السيفيبيم Cefepimeبنسبة (60%) والـ MIC يتراوح بين (1-64) و السيفتازيدم Ceftazidime بنسبة (50%) والـ MIC يتراوح بين (2-64) وكانت مقاومة العزلات للمضاد تيجَسيكلين Tigecycline بنسبة (100%) وتراوحت قيمة الـ MIC بين (2-8)، كما تساوت المقاومة للمضادين السيبروفلوكساسين Ciprofloxacin و الليفوفلوكساسين Levofloxacinوكانت مقاومة العزلات متساوية لكلاهما بنسبة (75%) وقيمة الـ MIC تراوحت بين (0.25 -4)، (0.5 -8) على التوالي .

مما تقدم يتضح ان اكثر قيمة MIC للعزلات للمضادات Tazobactam ، Piperacillin Tazobactam ، Piperacillin ، Ticarcillin clavoulanic acid كانت (128) ، في حين ان الـ MIC لجميع العزلات كان قليلا للمضاد Ciprofloxacinوقيمته (0.25) ،اتفقت نتائج الدراسة الحالية نوعا ما مع ما وجدته Al (Doory ،2012) التي حددت نسبة مقاومة عزلات *P.aeruginosa* والمعزولة من الحروق والجروح للمضادات التيكارسلين و التيكارسلين كلا فولانيك أسد و البيبراسيلين بـ (100%) وللمضادين السيفيبيم و السيفتازيدم بنسبة(74.3 % ,61.6 %) كما أبدت عزلاتها مقاومة متساوية بنسبة (53%) للمضادين الاميبنيم و الميروبنيم بينما انخفضت مقاومة العزلات بنسبة (30.7%)للمضاد البيبراسيلين تازوباكتام ،اختلفت مع الدراسة الحالية بانخفاض المقاومة لمضاد السيبروفلوكساسين بنسبة (20.6%) ، كذلك الحال مع دراسة أجريت في إيران لـ (Salimi وآخرون ،2009) أعطت فيها عزلات لبكتريا *P. aeruginosa* معزولة من أخماج الحروق مقاومة للمضاد البيبراسيلين بنسبة و للمضادين الاميبنيم و الميروبنيم بنسبة (37.2% ,15.5%) على التوالي (79.1%)، كما وتتفق نتائج الدراسة الحالية مع نتائج (Bdiwee ،2011) اللذي بين بان نسبة المقاومة للمضادان التيكارسلين كلا فولانيك أسد و البيبراسيلين كانت (100%) ،كذلك تتفق مع دراسات كل من

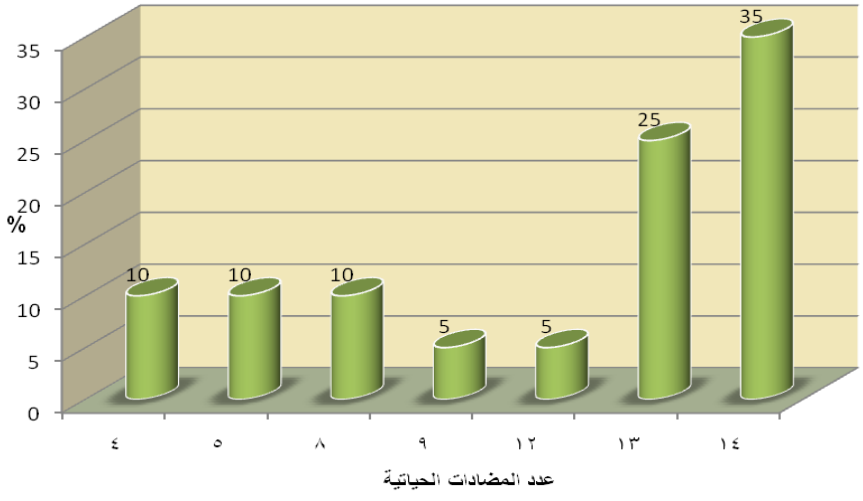
(الدواف ،1993)(الخز علي ،2009)(الشويخ ،2006) و(Abdul-Razzak ،2000)في مقاومة بكتريا*P. aeruginosa*للمضادين السيفوتاكسيم و السيفازولين وبنسبة (100%)، ولكن اختلفت مع (الشويخ ،2006) بانخفاض المقاومة للمضاد السيبروفلوكساسين بنسبة %) (4 ،و الحساسية العالية لمضاد الاميبنيم بنسبة (100%)و مقاومة للمضادات الاميكاسين ،الجنتامايسين و التوبرامايسين بنسبة (6%, 52%, 26%) على التوالي، بينما اتفقت مع الباحث (Dharوآخرون ،2007) وكانت المقاومة عالية للمضادات الجنتامايسين ، التوبرامايسين والاميكاسين بنسبة (65%, 79.6%, 100%) (على التوالي، كما بين (Kline ، وآخرون ،2014) في دراسة أجريت في الشرق الأوسط وإفريقيا أن البكتريا السالبة لصبغة كرام أبدت مقاومة عالية للمضاد تيجاسيكلين بنسبة (82.9%)وذكر (Chrles واخرون ،2014) ان بكتريا *P.aeruginosa*ابدت مقاومة عالية اتجاه مضاد تيجاسيكلين عند الـ MIC(8) ،طابقت نتائج الدراسة الحالية نتائج دراسة (Saxena وآخرون ،2014) التي اجريت بالهند ابدت عزلات بكتريا P. aeruginosaالمعزولة من المرضى المصابين بالتهاب المجرى التنفسي السفلي مقاومة اتجاه المضاد الليفوفلوكساسين وبنسبة (74%) كما اتفقت الدراسة الحالية مع دراسة (Burqess واخرون ،2003) التي أجريت في الولايات المتحدة الأمريكية أبدت فيها عزلات بكتريا *P.aeruginosa* مقاومة اتجاه مضاد الليفوفلوكساسين بنسبة (67%)، ، بينما كانت المقاومة لمضاد السفتريازون اقل بنسبة (67.54 %) ومتطابقة مع نسبة المقاومة للمضادين الجنتامايسين والسيبروفلوكساسين (100%, 65 %) على التوالي في دراسة أجرتها الباحثة (الصفار ،2005) ، بينما أوضحت دراسة (Freitasو Barth ، 2002) بان نسبة المقاومة لمضاد السفتريازون (47 %) وهي قريبة للدراسة الحالية ، كما أشار (Pitt وآخرون ،2003) التي أجريت في انكلترا إن نسبة المقاومة للسيفتازيديم كانت (39%)،كما اختلفت مع الباحث (Hsuوآخرون ،2005) حيث أبدت عزلاته مقاومة للمضادات الاميكاسين ، الجنتامايسين و التوبرامايسين بنسبة (23%, 48%, 58%) على التوالي .

ان ما يفسر هذه النتيجة هو امتلاك بكتريا*P.aeruginosa* ميكانيكيات عديدة في المقاومة للمضادات الحيوية ، اذ تظهر النتائج الواردة في الجدول(4-3) و الشكل (4-3) ان

16 عزلة من العزلات المشمولة بالدراسة كانت مقاومة لـ (8– 14) مضاد حيوي من عدد المضادات البالغ (16) مضادا بينما تظهر (2) عزلتين مقاومتها لـ (5) مضادات و عزلتين مقاومة لـ(4) مضادات ،اثبت تحليل النتائج إحصائيا وجود فروق معنوية عالية على المستوى ($P\leq0.01$).

الجدول (4-3) النسب المئوية للمقاومة المتعددة للمضادات الحيوية

عدد المضادات الحياتية التي قاومتها العزلات	العزلات الجرثومية المقاومة	
	العدد	النسبة المئوية%
4	2	10
5	2	10
8	2	10
9	1	5
12	1	5
13	5	25
14	7	35
المجموع الكلي	2o	%100
قيمة مربع كآي (χ^2)	----	9.017 **
** ($P\leq0.01$).		



الشكل (4-3) النسبة المئوية للمقاومة المتعددة للمضادات الحيوي

وقد اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع نتيجة الدراسة التي قامت بها الشويخ ،(2006) اذ أشارت إلى إن (47) عزلة من بكتريا *P.aeruginosa*كانت تقاوم (6 – 13) مضادا

ووثق ان هذه المجموعة هي السائدة إذ كانت نسبتها (97 %) وهذا يتقارب مع نتيجة دراستنا إذ بلغ عدد العزلات التي قاومت (8 – 14) مضادا حيويا هي (16) عزلات بنسبة (80 %) . أشار (Henrichfreiseوآخرون ،2007) إلى أن أسباب انتشار المقاومة المتعددة للمضادات في بعض مستشفيات ألمانيا إلى الاستعمال العشوائي للمضادات من قبل المرضى المراجعين للمستشفى وكذلك الراقدين فيها ، وأكد Mohrوجماعته إلى أن أفضل الوسائل لمنع انتقال المقاومة المتعددة للأدوية من قبل الممرضات هو الاستعمال المنطقي للمضادات الجرثومية فضلا عن التقييد بوصفة الطبيب المختص والذي يوفر الاستفادة المثلى للمضادات الجرثومية (Mohr و آخرون ، 2002).،إذ تؤدي زيادة استعمال هذه المضادات في العلاج إلى زيادة نسبة المقاومة لها بين العزلات السالبة لصبغة كرام (WHO, 2011)

يلاحظ مما تقدم إن بكتريا الـ*P.aeruginosa* المعزولة من أخماج الحروق والجروح أظهرت مقاومة متعددة للعديد من المضادات الحيوية ومن ضمنها الأجيال الحديثة، وهذه المقاومة قد تكون سببها تغير الغشاء الخارجي للجرثومة عن طريق فقدان فتحات الغشاء الخارجي Outside membrane porins والذي يقوم بوظيفة نقل المضاد إلى داخل الخلية (Lambert ،2002 ؛ شاهين و رند ، 2008)، كما بين بعض الباحثين وجود تفاعل وتداخل بين إنزيمات البيتالاكتاميز الكروموسومية واسعة الطيف و مضخات الدفق المتعددة للعقاقير Efflux systems ويسيطر عليها جين اسمه(MexAB-OprM Koren و Vaculikova ،2006) ، فضلا عن وجود جينات المقاومة المتعددة للمضادات لدى هذه البكتريا (Mushtaq وآخرون ،2004) ،كما أن بكتريا الـ *P.aeruginosa* تحتوي على بلازميد المقاومة R- plasmid الذي يمنح هذه البكتريا المقاومة للعديد من المضادات الحيوية (Nordmann وآخرون ، 2005). قد تكون مقاومة المضادات الحيوية محمولة على بلازميد يشفر لصفة المقاومة لاكثر من مضاد حيوي واحد ومن ثم قد تنتقل المقاومة المتعددة بين البكتريا المرضية المختلفة وقد اشار (Askoura وآخرون ،2011) إلى تطور وانتشار المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية المحمولة على بلازميد متحرك بين البكتريا المرضية وخصوصا المقاومة للاجيال الجديدة من هذه المضادات (Asad و Amna ، 2004)،اظهرت دراستنا ان اغلب العزلات المحلية كانت تحمل صفة المقاومة المتعددة لاكثر

من مضاد حيوي وقد سجلت هذه الملاحظة من قبل العديد من الباحثين (الصفار ،2005 والشويخ ،2006 و Al Doory ،2012) اذ وجدوا ان اغلب عزلاتهم المحلية العائدة الى بكتريا *P.aeruginosa* والمسببة لخمج الجروح والحروق تحمل صفة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية.

نستنتج مما سبق أن عزلاتنا المحلية يمكن ان تكون لديها اكثر من آلية مقاومة للمضادات الحيوية كأن تكون قادرة على تكوين الغشاء الحيوي ولديها حاجز نفاذية يمنع دخول جزيئات المضاد ، كذلك ممكن أن تكون منتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف وأيضا ممكن ان تكون قادرة على أنجاز أنظمة الدفق وتغيير مواقع الهدف كل هذه ممكن أن تكون أسباب مقاومة عزلاتنا المحلية لأكثر المضادات الحيوية .

المصادر :-

1. **Kharazmi**, A. (1991). Mechanisms involved in the Evasion of the Host Defence by *Pseudomonas aeruginosa* . Immunology Letters. 30 (2) : 201 – 205.
2. **Pitt**, T., Sparrow, M., Warner, M. and Stefanidou, M., (2003). Syrvey of Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* from UK patients with Cystic fibrosis to six commonly prescribed antimicrobial agents. Thorax. 58 : 794 – 796 **.**
3. **Rastegar**, L.A.R.; Alaghehbandan, R. and Akhlaghi, L. (2005). Burn wound infections and antimicrobial resistance in tehran, Iran:an increasing problem . Annals of Burns and Fire Disasters. XVIII(2) : 1-9.
4. **Zubair** M1, Malik A1, Ahmad J2, Rizvi M1, Farooqui KJ2, Rizvi MW.(2011). A study of biofilm production by gram-negative organisms isolated from diabetic foot ulcer patients. J. Bio. Med., 3 (2) : 147-157
5. **Ong**, Y.S., Samuel, M. and Song, C. (2006). Meta-analysis of early excision of burns. Burns. 32(2):145-150.
6. **Baldwin**, C.M.; Lyseng-Williamson, K.A. and keam, S.J. (2008). Meropenem : a review of its use in the treatment of serious bacterial infections . Drugs. 68(6):803-38.
7. **Levy**, S. B. (2002). Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. J. Appl. Microbiol. 92:65S–71S.
8. **Carmeli**,Y., Troillet, N., Eliopoulos, G.M. and Samore, M.H.(1999). Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. J. of Antimicrob. Agents Chemother. 43(6): 1379 -82.

9. Collee, J.G.; Fraser, A.G.; Mjarmion , B.P. and Simmons, A. (1996). Mackie and McCartney paractical medical microbiology . 44(3): 1524-9.

10. Hawkey, p. M. and D. A. Lewis (eds.). (1989). Medical Bacteriology : A Practical Approach. IRL Press. Oxford.

11. Baron, E.J.; Petersond, L.R. and Finegold, S.M. (1994). Baily and Scott's diagnostic microbiology . (9th ed.), Mosby company , USA.

12. Holt, J.G.; KJrieg, N.R.; Sheath, P.H.; Stalely, J.T. and Williams, S.S.T. (1994). Bergy's Manual of Determinative Bacteriology . (9th ed.) Williams and Wilkins U.S.A.

13. Baron, E.J. and Feingold, S.M. (1990).Bailey& Scott's Diagnostic Microbiology .(8th ed.) Mosby . USA .

14. Atlas, R.M.; Parks, L.C.; and Brown, A.E. (1995). Laboratory Manual of Experimental Microbiology .(1st ed.) Mosby. USA.

15. Brooks, G.F., Butel, J.S. and Morse, S.A. (2001). Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology (22nd ed.) McGraw – Hill . USA.

16. Patricia , M. Tille (2014). Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. Mosby.

17. Clinical Laboratory Standards Institute. (2014). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test.

18. ألخالصي ، علي حسين علأ الدين .(2014) . دراسة تأثير التثبيطي لعسل النحل المحلي ضد الإصابة البكتيرية واستعماله في معالجة الجروح والحروق .رسالة ماجستير ،كلية التربية الاساسية ، الجامعة المستنصرية.

19. Pruitt J., B. A., Lindberg, R. B. , McManus, W. F. and Mason Jr, A. D. (2001) Current Approach to Prevention and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Burned Patients. J.Clin. Infect. Dis. 5: 889-8**.**

20. Closky , A.;Kirsner,R. and Kerdel,F.(1998).Microbiology evaluation of cutaneous wound in hospital dermatology patients . Ostomy-Wound-Manage.44(3):40-46.

21. Al-Dahmoshi, Hussein Oleiwi Muttaleb (2013). Genotypic and Phenotypic Investigation of Alginate Biofilm Formation among *Pseudomonas Aeruginosa* Isolated from Burn Victims in Babylon, Iraq . Babylon University, Science Faculty-Biology Department, Iraq .

22. ملا خليل ، عمار خالد شهاب . (2012). عزل وتشخيص بعض مسببات اخماج الجروح ودراسة تأثير ليزر ND-YAG على هذه المسببات . رسالة ماجستير . كلية العلوم. جامعة تكريت .

23. Al Doory, Iman Alwan Hussien **.**(2012). A diagnostic Study of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Contaminated Burns and

Wounds Using Cultural and Molecular Methods. thesis of master.University of Baghdad.

24. **Salimi**, H., Owlia, P., Yakhchali, B. and Lari, A. R. , (2009) Drug Susceptibility and Molecular Epidemiolog *Pseudomonas aeruginosa* Isolated in a Burn Unit. Am. J. Infect. *Dise.* 5 (4): 308-313.
25. **Bdiwee**, Salwa G. (2011). Assessment of the Resistance of the *Mycobacterium tuberculosis* to antibiotics and investigating the Associated Bacteria in the Patients. MSc. Thesis in Biology \ Microbiology \ College of Science for Women \ University of Baghdad.

26. **الدواف** ، هند محسن . (1993) . تأثير المطهرات الكيميائية على الجراثيم الملوثة في حالات العمليات الجراحية . رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة بغداد .

27. **الخزعلي** ، ختام علي عبيد .(2009) . مقاومة بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus* المعزولة من اخماج الحروق والجروح للمضادات الحيوية و بعض المطهرات . رسالة ماجستير ،كلية العلوم ،الجامعة المستنصرية .

28. **الشويخ** ، رنا مجاهد عبد الله . (2006) . انتاج وتوصيف Protease من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من بعض الحالات السريرية وعلاقته ببعض المضادات الحيوية . اطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية.

29. **Abdul-Razak**, H.H. (2000). Effect of some β – Lactamase inhibitors and combined action of some antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa* resistant to antibiotics and some heavy metals isolated from Otitis Media : genetic study . Thesis of Master . College of Science . Al-Mustansiriya University .
30. **Dhar**, S.,Saraf, R.,Singh K., and Raina, B.(2007).Microbiological Profile of Chronic Burn Wounds among Paitients admitted in Burn Unit. J.K. Sci. 9(4):182-185.
31. **Kline, G.S.** (2014) Ticarcillin and Clavulanic Acid for Injection, USP Antibiotic and ß-Lactamase Inhibitor. Product Monograph ,34:13-18.
32. **Chrles** R., Melissa A., Steven J., Phaik E., and Patricia A.(2014).Efflux-Mediated Resistance to Tigecycline (GAR-936) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Antimicrob. Agents Chemother. 58:10 5643-5649.
33. **Saxena**, S.; Banerjee, G.; Garg, R. and Singh, M. (2014). Comparative Study of Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Pationts of Lower Respiratory Tract infection . J. Clin. and Dia. Res. Vol-8(5): DC09-DC11.

34. الصفار، انوار كاظم حسين . (2005). دراسة وراثية لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المسببة لاخماج الحروق والجروح في محافظة بابل . رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية .

35. Freitas, A.L.P. and Barth, A.L. (2002). Antibiotic resistance and molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa* : Focus on Imipenem . The Brazilian Journal of Infection Diseases.

36. Pitt, T., Sparrow, M., Warner, M. and Stefanidou, M., (2003). Syrvey of Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* from UK patients with Cystic fibrosis to six commonly prescribed antimicrobial agents. Thorax. 58 : 794 – 796 **.**

37. Hsu, D.I., Okamoto, M.P., Murthy, R. and Wong-Beringer, A. (2005) . Fluoroquinolone resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors for acquisition and impact on outcomes. J. Antimicrob. Agents Chemother. 22:1-7.

38. Henrichfreise, B., Wiegand ,I., Pfister W. and Wiede, B. (2007) .Resistance Mechanisms of Multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains from Germany and Correlation with Hypermutation. J.Antimicrob. Agents Chemother. 51(11): 4062–4070.

39. WHO global strategy for containment of antimicrobial resistance. Geneva: World Health Organization; (2011). (Avenue Appia 20, 1211 Geneva 27, Switzerland).

40. Lambert, P. A. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. J.of The Royal Soc. of Med. 95: 22-26.

41. شاهين، عمر و رند عمر شاهين. (2008). المضادات الحيوية. دار الفكر، عمان ، الأردن. الطبعة الأولى.

42. Koren, J. & Vaculikova, A,.(2006). Development of β-lactamase resistance in Enterobacteria , Klin . Microbiol. Infect. Lek. 12(3):103-107.

43. Mushtaq, S.;Ge, Y. and Livermore, D.M. (2004). Doripenem versus *Pseudomonas aeruginosa invitro* Activity against characterized isolates, Mutants and Transconjugants and resistance selection potential. J.Antimicrob. Agents Chemother. 48(8)3086-3092.

44. Nordmann, P and Poirel,L. (2005). Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae .56 :463-469.

45. Askoura, M.; Mottawea, W.; Abujamel, T. and Taher, I. (2011). Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa* . Liby. J. Med. 6(6):5870-5878.

46. Asad,U.K. and Amna,M.(2004).Plasmid-mediated multple antibiotic resistance in *Proteus mirabilis* isolated from patients with urinary tract infection ,Med.Sci. monit.(10)598-602.

Study The Multy Resistance to Antibiotic of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Burn and Wound Infection Performed By Vitek2compact

Summary:-

The study includes the collection of 70 burns and wound swabs from patients of different hospitals, in Baghdad area, for the period from November 2013 to February 2014 , 31 isolates characterized as *Pseudomonas aeruginosa* 9 (45%) from wound and 22 (78.57%) from burn swabs ,depending on the characteristics of the colonies phenotypic and microscopic when grown in differential selective media, as well as biochemical tests to diagnose isolates, Then the identification of these species were confirmed by using the system (GN I Card) using Vitek 2 device complementary step . The study includes sensitivity test towards 16 antibiotics for each species by using the system (AST Card) using Vitek 2 device, and the isolates ware Multi drug resistance , As results all isolates were resistant by 100 % for each of Piperacillin, Ticarcillin, Ticarcillin clavoulanic acid, Cefazolin, Ceftriaxone and Tigecycline . All strains were less resistance to Ceftazidime with percentage 50% , The minimal inhibitory concentrations (MICs) of some antibiotics were determined by using the system Vitek 2 device ,and the result determined as (R: resistance and S: sensitive) .