Detection of Genome Content of Pseudomonas Aeruginosa Biofilm Formation and Resistance to Some Disinfectants and Antibiotics

Dr.Fatimah Ramadhan Abdel
Science College, University of Al-Mustansiryia /Baghdad.
Maysoon Khaleefa Abbas
Science College, University of Al-Mustansiryia /Baghdad.
Firas Nabih Jaafar
Science College, University of Al-Mustansiryia /Baghdad.
Maha Mukhlif
Science College, University of Al-Mustansiryia /Baghdad.

Received on:17/6/2014 & Accepted on:17/9/2015

ABSTRACT

This study have been included forty isolates of the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Department of biology / College of Science / University of Mustansiriya from different clinical specimens it was diagnosis based on the methods of microscopic , cultural and biochemical and final diagnosis using Vitek 2system . The ability of the isolates to produce biofilm was tested using Congo Red Agar Method (CRA).The result showed that (١٢) isolated (30%) are biofilm producer. Antibiotic sensitivity test have been done multiple drug resistance the revealed showed that isolates had moreover all clinical isolates of *P. aeruginosa* (%١٠٠) were resistant to Piperacillin, Amoxicillin / Clavulanic acid, Cephalexin, Ceftriaxone and Ceftazidime and while the isolates gradually were resist to other antibiotics until showed less resistant to the Imipenem (%١٦.٧).In addition, the minimum inhibitory concentration (MICs) for *P. aeruginosa* isolates were determined to five antibiotics included (Amikacin, Ciprofloxacin Ceftriaxone, Ceftazidime and Imipenem) and three types of disinfectants (Povidin - Iodine, Chloroxylenol, Formalin) . Bacterial isolates under this study were showed high resistance to both Ceftriaxone and Amikacin. The rang of (MICs) Values was between (16-512) µg / mL. the results showed Values of the (MICs) of disinfectant formalin was low compared other disinfectants in this study. Since rang values (MICs) between (512-2000) µg / mL, (512-3500) µg / mL for Dettol and (1024-4000) µg / mL for Iodine solution. The study also showed that sensitivity percentage increased with increasing of disinfectant concentration.

All isolates showed negative results for of Metallo-β-lactamase by EDTA method and PCR showed negative results for both of bla_{SHV} and bla_{TEM} genotype , While isolates showed positive results for bla_{CTX-M}.

تحديد المحتوى الجيني لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المنتجة للغشاء الحيوي والمقاومة لبعض المطهرات والمضادات الحيوية

الخلاصة

تضمنت الدراسة 40 عزلة من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من عينات مرضية مختلفة، وتم اختبارها بواسطة الطرق المجهرية والزرعية والاختبارات الكيموحيوية واكدت بواسطة نظام الفايتك . اختبرت

https://doi.org/10.30684/etj.34.1B.20
2412-0758/University of Technology-Iraq, Baghdad, Iraq
This is an open access article under the CC BY 4.0 license http://creativecommons.org/licenses/by/4.0

مقدرة العزلات على انتاج الغشاء الحيوي باستخدام طريقة (Congo Red Agar Method (CRA، واظهرت النتائج ان (12) عزلة بنسبة (٣٠%) منتجة للغشاء الحيوي. اجريت دراسة الحساسية للعزلات تجاه ثلاثة عشر مضادا حيويا ، وقد تبين ان العزلات تحمل صفة المقاومة المتعددة للمضادات (multi drug resistance) اذ اظهرت جميع العزلات السريرية لبكتريا *P. aeruginosa* (١٠٠%) مقاومة للمضادات Piperacillin ، Amoxicillin / Clavulanic acid، Ceftazidime، Ceftriaxone،Cephalexin ثم تدرجت مقاومة البكتريا لبقية المضادات حتى اظهرت اقل مقاومة لمضاد Imipenem بنسبة ١٦.٧% . تم تحديد التركيز المثبط الادنى (MICs) لعزلات بكتريا *P. aeruginosa* لخمسة من المضادات الحيوية Amikacin، Ciprofloxacin Ceftriaxone، Ceftazidime ، Imipenem و لثلاثة انواع من المطهرات الكيمياوية والتي شملت الكلوروزايلينول (ديتول)، البوفدين ايودين (محلول اليود) والفورمالين. اظهرت العزلات قيد الدراسة مقاومة عالية لمضادي Amikacin و Ceftriaxone اذ تراوحت قيم الـ (MICs) لهما ما بين (١٦-٥١٢) مايكروغرام/مل .كما بينت النتائج ان قيم ال (MICs) لمطهر الفورمالين كان أوطئ مقارنة بتركيز المطهرين المستخدمين في الدراسة اذ تراوحت ما بين (٥١٢- ٢٠٠٠) مايكروغرام/مل، الديتول ما بين (٥١٢- ٣٥٠٠) مايكروغرام/مل، ومحلول اليود مابين (١٠٢٥-٤٠٠٠) مايكروغرام/مل ، وان نسب الحساسية تزداد بازدياد تركيز المطهر.
جميع العزلات اظهرت نتيجة سالبة لانتاج انزيم Metallo-β-lactamase بطريقة EDTA ، وكانت سالبة النتيجة لكل من جين bla_{TEM} و bla_{SHV} بطريقة PCR ، بينما اظهرت العزلات نتيجة موجبة لجين bla_{CTX-M} .

المقدمة

بكتريا *P.aeruginosa* من العصيات مستقيمة سالبة لصبغة كرام ، وهي بكتريا هوائية اجبارية aerobic تمتاز بفعاليتها الايضية المؤكسدة Oxidative metabolism موجبة لاختباري الاوكسديز والكتاليز ولا تخمر السكريات المختلفة الا انها تخمر سكر الكلوكوز وتنتج حامضاً ولا تنتج غاز و تحلل اليوريا بشكل بطيء وغير مكونة للسبورات وبعض سلالاتها لها القدرة على تكوين المحفظة Capsule ، وتمتاز بقابليتها على استهلاك السترات كمصدر كاربوني [1] .

من الصفات المميزة لهذه البكتريا هي انتاجها للصبغة الخضراء المزرقة Pyocyanin الذائبة في الماء ، اذ تبدو المستعمرات النامية باللون الأخضر الفستقي المنتشر في جميع الوسط ، وهذه الصبغة هي السبب في انبعاث رائحة الفاكهة المتعفنة التي تشبه رائحة العنب المتخمر من الوسط الزرعي الذي تنمو فيه هذه البكتريا [2]، تكون بكتريا *P. aeruginosa* المنتجة لانزيمات (Metallo-β-lactamase) مقاومة ليس فقط لمجموعة β-lactams ولكن أيضا تكون مقاومة لمجموعة aminoglycosides ومجموعة fluoroquinolones لذلك تكون الادوية المستعملة لمعالجة الاصابات التي تسببها هذه البكتريا قليلة لذلك تكشف الدراسات للتحري عن أنزيمات (Metallo-β-lactamase) ومن اجل الحصول على العلاج المثالي لحالات الاصابة الحرجة التي تسببها هذه البكتريا لغرض الحد من انتشار هذه المقاومة[3] .

تقاوم البكتريا مضادات الكوينولينات من خلال حدوث تغيير في موقع الهدف لأرتباط المضاد الى الأنزيم، إذ يحدث التغير في GyrA الذي يعد من الوحدات البنائية لأنزيم DNA gyrase [4]. يعرف ال glycocalyx بأنه مادة مخاطية متكونة من معقد متعدد السكريات الخارجية ذات المنشأ البكتيري، يدخل فيها أيضا مواد خارجية توجد في بيئة الكائن المجهري مثل الأحماض النووية، البروتينات، المعادن، المغذيات ومواد الجدار الخلوي وغيرها[5].

أما من الناحية الطبية فان الأغشية الحيوية تعد مجتمعات بكتيرية مرتبطة بالأسطح تتواجد داخل قالب من بوليمرات خارج خلوية تظهر أنماطًا مظهرية متغايرة للنمو، التعبير الجيني وإنتاج البروتين، ويمكن أن تؤدي إلى عواقب طبية واقتصادية [6] يساعد الغشاء الحيوي البكتريا في البقاء حية في الظروف القاسية داخل المضيف او العائل وتعد مسؤولة عن الإصابات المزمنة والمستعصية ومن هذه الأمراض التهاب شغاف القلب، التليف الكيسي، التهاب الأذن الوسطى، الإصابات المتعلقة بالأدوات الطبية، إصابات القثاطر، التهاب اللثة وتسوس الأسنان وغيرها [7] اذ تبدي البكتريا في الأغشية الحيوية درجة عالية من المقاومة للعوامل المضادة للجراثيم وجهاز مناعة المضيف إن أكثر من % 20 من جينات البكتريا في الغشاء الحيوي يتم تعبيرها بصورة مختلفة والذي قد ينتج عنه حماية اكبر ضد خلايا البلعم الكبير، كما أن البكتريا تنمو ببطء وتكون فعاليتها الايضية بطيئة، وتنتج البكتريا مركبات ضمن الغشاء الحيوي تعادل تأثير المضادات الحيوية [8] اكتسبت الجراثيم بمرور الزمن المقاومة للمطهرات بمختلف أنواعها، ولازالت هذه المقاومة في تزايد مستمر رغم تزايد أنواع المطهرات وشدة فعاليتها وتعد جرثومة *P. aeruginosa* من الجراثيم المعروفة بقدرتها على مقاومة العديد من المطهرات الكيميائية . أشارت الدراسات إلى زيادة عزل سلالات هذه الجرثومة المقاومة للمطهرات، مما يشكل أحد الصعوبات التي تواجه عمليات التطهير في المستشفيات وغيرها من المؤسسات الصحية [9] هدفت الدراسة الحالية إلى التحري عن قدرة

بعض الأنواع البكتريا الممرضة على إنتاج المادة المخاطية أو الغشاء الحيوي مختبرياً باستخدام طريقة وسط أكار الكونغو الأحمر(CRA) Congo Red Agar Method والكشف عن التراكيز الملائمة من المطهرات للتغلب على مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية .

المواد وطرائق العمل

العزلات البكترية : تم الحصول على ٤٠ عزلة من بكتريا *P. aeruginosa* من مختبرات قسم علوم الحياة /كلية العلوم /الجامعة المستنصرية تعود لعينات مرضية مختلفة وتم تأكيد تشخيصها استنادا الى الطرق المجهرية والزرعية والاختبارات الكيموحيوية والتشخيص النهائي باستخدام نظام الفايتكBio Vitek 2Compact) Merieux France)

- تم اختبار (12) عزلة من بكتريا *P. aeruginosa* من مجموع (40) عزلة والتي اظهرت قدرتها على انتاج الغشاء الحيوي Biofilm باستعمال وسط اكار الكونغو الاحمر Congo Red agar Medium [10], وعدت النتيجة موجبة ، بتكوين مستعمرات سوداء مع اتساق بلوري جاف ، بينما اعتبرت النتيجة السالبة اذا بقيت المستعمرات بلون وردي.
- فحص الحساسية للعزلات المكونة للغشاء الحيوي تجاه (١١) مضاداً حيوياً مختلفاً شملت اهم الاقراص المستخدمة (Bio analyse/Turkey) ، وكما في الجدول (1) .

جدول (1) يمثل اقراص المضادات الحيوية المستخدمة .

المضـادات الحيوية	الـرمـز	تركيز المضاد/القرص (مكغم/قرص)
Amikacin	AK	30
Amoxicillin/Clavulanic acid	AMC	20/10
Azithromycin	AZM	30
Ceftazidime	CDZ	30
Ceftriaxone	CRO	30
Cephalexin	CL	30
Ciprofloxacin	CIP	10
Imipenem	IPM	10
Levofloxacin	LEV	5
Norfloxacin	NOR	10
Piperacillin	PRL	30
Ticarcillin/Clavulanic acid	TIM	75/10
Tobramycin	TOB	5

تم اجراء الاختبار باستعمال وسط مولر هنتون الصلب (Mueller-Hinton agar) وتم اعتماد حساب الاقطار التثبيطية حسب ما جاء في CLSI [11].

- مساحيق المضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة شملت:

Ceftriaxone (Julphar / UAE) , Ceftazidime (Sarbach / france) (Imipenem Dohme USA)

Amikacin (Zentiva/Turkey) ,Ciprofloxacin(Aianta/India).

وكما في الجدول(2)

جدول(2) انواع المطهرات الكيميائية المستخدمة

ت	الاسم التجاري	الاسم العلمي	التركيز التجاري gm/100ml	الشركة المصنعة
1	محلول اليود - Iodine Solution	Povidin - Iodine	10	شركة الرحمة (الاردن)
2	ديتول Dettol	Chloroxylenol	5	شركة سامراء (العراق)
3	فورمالين Formalin	Formaldehyde	11	شركة سامراء (العراق)

استعملت جميع المطهرات بتركيز 5% كمحاليل خزينة Stock solution [12].

- **الكشف عن انتاج انزيم (Metallo-β-lactamase)**

اعتمدت طريقة EDTA للكشف عن قابلية البكتريا على انتاج انزيم Metallo-β-lactamase [١٣].

- **عزل DNA البكتيري**

تم عزل دنا العزلات البكتيرية باعتماد عدة استخلاص الدنا المجهزة من شركة Promega (USA) ورحلت نتائج الاستخلاص باستعمال هلام بتركيز (١%).

- **التحري عن الجينات المشفرة لانزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBL بطريقة PCR**

اختبرت البؤادى النوعية المستهدفة لجينات bla_{TEM} ، bla_{CTX-M} و bla_{SHV} في بكتريا *P.aeruginosa* قيد الدراسة كما مبين في الجدول (٣) ، تم تحضير محاليلها الخزينة حسب تعليمات الشركة ألمجهزة (Alpha DNA/Conada) باستعمال الماء المقطر اللايوني المعقم للحصول على تركيز ١٠٠ بيكومول/مايكروليت.

حضر قالب الدنا DNA باستعمال دارئ التفاعل (Green Master Mix) والبادئ النوعي لكل جين (Alpha DNA/Conada)، تم اضافة كل بادئ الى مزيج الـ PCR جدول (٣). مزيج الـ PCR يتكون من (٢.٥) مايكروليتر من (Green Master Mix) ،(٥) مايكروليتر من قالب DNA ، اضيفت البوادئ النوعية بتركيز (١٠) بيكومول / مايكروليتر، أكمل المزيج الى ٢٥ مايكروليتر بواسطة اضافة محلول (nuclease free distilled water). جرت التفاعلات بظروف خاصة جدول (٤) ، بواسطة الدورة الحرارية للـ PCR (الشركة المصنعة للجهاز Tech.Net. 500 USA). بعد عزل الدنا DNA تم الترحيل على هلام الاكاروز Cleaver scientific/Taiwan. تم فحص الهلام بعد انتهاء الترحيل من خلال تعريضه لمصدر للأشعة فوق البنفسجية وتم تقدير الاحجام الجزيئية للقطع المتضاعفة بالمقارنة مع موقع الحزم للدليل الحجمي المستعمل والمُرحل مع نواتج التضاعف.

تم تحضير محلول لكل بادئ وبشكل منفصل بتركيز 10بيكومول/ مايكروليتر وذلك بأخذ 10مايكروليتر من محلول الخزين لكل بادىء واضافته الى ٩٠ مايكروليتر من الماء المقطر اللايوني ومزج جيدا وحفظ في الثلج لحين الاستعمال في حين حفظت المحاليل الخزنية للبوادىء في درجة 20° C مع مراعاة مزج المحلول بعد اخراجه من الثلج باستعمال المازج لمجانسته قبل الاستعمال

جدول (٣): تتابعات وتراكيز البوادئ وحجم الناتج المتوقع لكل بادئ

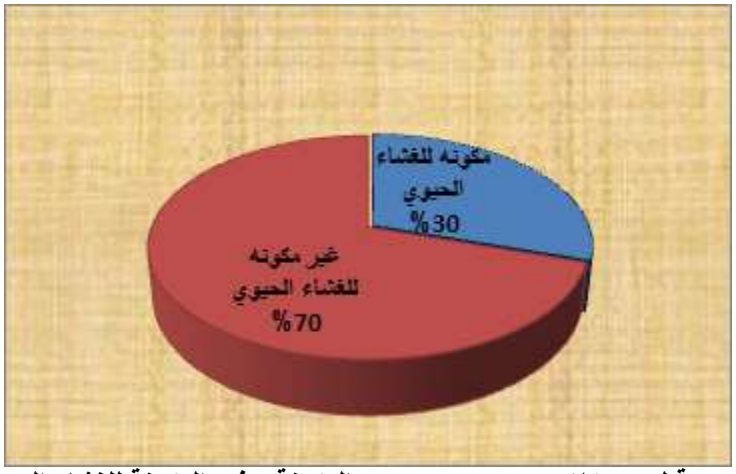
المصدر	التركيز Pmol/Ml	حجم الناتج (bp)	تتابع البادئ ٥' ⟶ 3'	البادئ
١٤	٧٥٢٣١	550	CGCTTTGCGATGTGCAG	bla_{CTX-M}F
	٦٢١٢٩		ACCGCGATATCGTTGGT	bla_{CTX-M}R
١٥	١٤٦٠٠	800	AAGATCCACTATCGCCAGCAG	bla_{SHV} -F
	١٦٠٠٠		ATTCAGTTCCGTTTCCCAGCGG	bla_{SHV}-R
١٥	١٣٦٠٠	950	GAGTATTCAACATTTCCGTGTC'	bla_{TEM}-F
	١١٨٠٠		TAATCAGAGGCACCTATCTC	bla_{TEM} -R

جدول (٤): ظروف التفاعل لل PCR لجينات bla_{CTX-M} ,bla_{TEM}, bla_{SHV} bla [5,4]

الجين	المسخ الاولي	عدد الدورات	المسخ	التحام البادئ	الاستطالة	الاستطالة النهائية
bla_{SHV}	95ºC / 5 min	35	95ºC / 1min	56ºC / 45 sec	72ºC / 1 min	72ºC / 10 min
bla_{TEM}	95ºC / 5 min	35	94ºC / 30 sec	56ºC / 45 sec	72ºC / 1 min	72ºC / 6 min
bla_{CTX-M}	94º C / 5 min	35	95ºC /30 sec	55ºC / 30 sec	72ºC / 1 min	72ºC / 6 min

النتائج والمناقشة

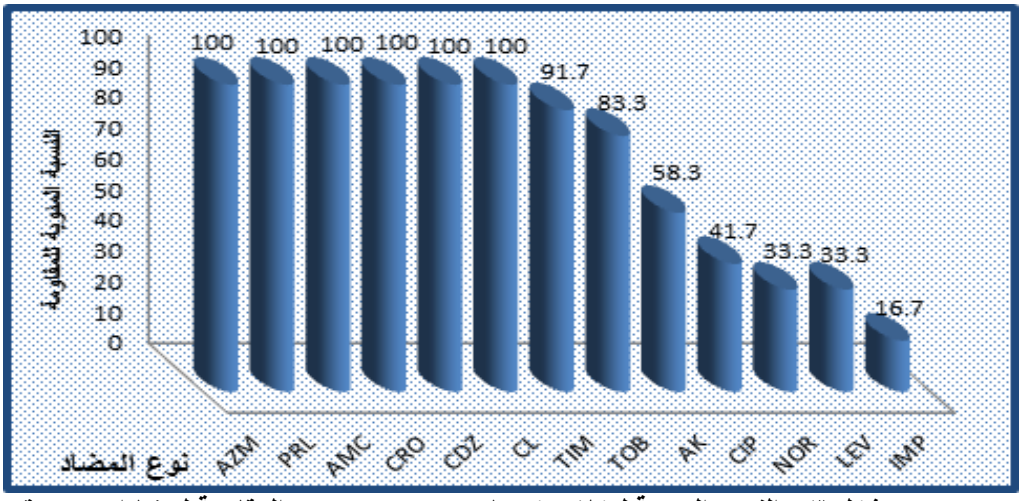
تم اختبار تكوين الغشاء الحيوي حسب طريقة احمر اكار الكونغو. اظهرت نتائج الدراسة لعزلات *P. aeruginosa* بعد فترة الحضن بدرجة حرارة ٣٧ م° لمدة (٢٤-٤٨) ساعة ، بان (١٢) عزلة من مجموع (٤٠) عزلة بنسبة ٣٠% كانت منتجة للغشاء الحيوي شكل (١) عندما ظهرت على سطح الوسط بشكل مستعمرات سوداء مع اتساق بلوري جاف كما في الشكل (٢). لوحظ أن طريقة CRA تعد طريقة واقعية لتمييز النمط المظهري للعزلات المنتجة للمادة المخاطية و ذات الضراوة العالية وان معرفة هذا النمط قد يساعد في التمييز بين المنتجات القوية والضعيفة للغشاء الحيوي والذي يعكس حدة الإصابة و يساعد في تحديد العلاج الأولي، وان الاختلاف في درجة إنتاج الغشاء الحيوي يعزى إلى الاختلاف في إنتاج لاصقات متعدد السكريات Polysaccharide adhesion و يعكس التغير في التنظيم الجيني [١٦] . استخدمت طريقة Congo Red agar Medium CRA للتحري عن إنتاج المادة المخاطية لعزلات عديدة كونها طريقة سهلة الاستخدام وتعتمد على تعزيز إنتاج السكريات المتعددة الخارجية باستخدام وسط غني ولكن يمكن اعتبارها قليلة الحساسية والتخصص نتيجة الاختلافات التي قد تحدث في تكون الصبغة السوداء للمستعمرات، وقد يؤثر الاختلاف في الوسط الزرعي المستخدم على نتائج هذه الطريقة تظهر البكتريا التي تنمو في الغشاء الحيوي اختلافات مظهرية متنوعة عن السلالة الأصلية التي تنمو في المزرعة بشكل حر، تشمل هذه الاختلافات تغيرات في الحركة، زيادة إنتاج السكريات المتعددة الخارج خلوية أحيانا وزيادة المقاومة للمضادات الحيوية [١٧] ،كما في الشكل(1). كانت نسبة المستعمرات السوداء على الوسط ٣٠% = Positive ، في حين كانت نسبة المستعمرات وردية على الوسط ٧٠%= Negative .



شكل (١):النسبة المئوية لعدد عزلات *P. aeruginosa* المكونة وغير المكونة للغشاء الحيوي على وسط اكار الكونغو الاحمر

شكل(٢): قدرة بكتريا *P. aeruginosa* على تكوين الغشاء الحيوي على وسط اكار الكونغو الاحمر
A- المستعمرات غير المكونة للغشاء الحيوي B- المستعمرات المكونة للغشاء الحيوي

أختبرت حساسية (12) عزلة من بكتريا *P. aeruginosa* قيد الدراسة لثلاثة عشر مضادا حيويا و أظهرت النتائج أن عزلات الدراسة تحمل صفة المقاومة المتعددة للمضادات Multi drug resistance وجدت الدراسة ان جميع العزلات السريرية لبكتريا *P. aeruginosa* كانت مقاومة بنسبة ١٠٠% للمضادات PRL, AMC, CRO, CAZ, CL, ثم تدرجت مقاومة البكتريا لبقية المضادات حتى بينت اقل مقاومة للمضاد IPM بنسبة ١٦.٧% شكل (3)، تتفق هذه نتائج مع نتائج دراسة سابقة [١٨] أذ تم التوصل الى ان عزلات *P. aeruginosa* المنتجة للغشاء الحيوي كانت مقاومة لمعظم مضادات البيتالاكتام وبنسبة ١٠٠%،بينما لمضاد Imipenem بنسبة ٢٠%، في حين كانت نسبة المقاومة لمضاد Ciprofloxacin ١٠٠% . في حين اثبتت دراسة اخرى [١٨] ان عزلات *P. aeruginosa* اظهرت مقاومة لمضاد AK بنسبة ٥٩.٣% ، في حين سجلت *P. aeruginosa* نسبة مقاومة للمضاد TOB بلغت ٦٧.٥% [٢٠] وهذا يختلف مع نتائج الدراسة الحالية.



شكل(٣): النسب المئوية لعزلات بكتريا *P. aeruginosa* المقاومة لمضادات متعددة

Amoxicillin/Clavulanic acid(AMC) Pipreracillin(PRLAzithromycin(AZM), Ceftriaxone(CRO), Ceftazidim(CDZ),), Cephalexin(CL), Ticarcillin/Clavulanic acid (TIM), Tobramycin(TOB), Amikacin(AK), Ciprofloxacin(CIP),Norfloxacin(NOR), Levoflaxacin(LEV),Imipenem(IMP).

تم تحديد التركيز المثبط الادنى MIC لعزلات *P. aeruginosa* تجاه خمسة مضادات حيوية Amikacin، Ciprofloxacin ، Ceftriaxone ، Ceftazidime، Imipenem واعتمدت نقطة التوقف Break point الموضوعة من قبل [12] كأساس لحساب الاستجابة وتمثل التركيز الامثل الذي يمكن ان يصلة المضاد في المصل بحيث يوفر اعلى حد من المعالجة ، اذ يعد الكائن حساسا Susceptible عندما تكون قيمة الـ (MICs) المحسوب اقل من نقطة التوقف يشير (جدول 5) الى ابداء العزلات البكتريا قيد الدراسة مقاومة عالية لمضاد Ceftriaxone و Amikacin اذ تراوحت قيم (MICs) للمضادين بين (١٦-٥١٢) مايكروغرام/مل ماعدا عزلة واحدة ابدت حساسية اتجاه مضادCeftriaxone ، اما بالنسبة لمضاد الـــ Ceftazidime فقد خضعت جميع العزلات لهذا الاختبار فكانت (١١) عزلة مقاومة لهذا المضاد ، اما باقي العزلات فكانت حساسة له وقد بلغت قيم ال (MICs) لهذا المضاد (٤-٥١٢) مايكروغرام/مل . نتائج الدراسة الحالية تتفق الى حد ما مع دراسة سابقة [21] تم الاشارة الى ان قيم الـ (MICs) التي بينتها عزلاتهم المدروسة تجاه مضاد Amikacin ما بين (١٦-١٢٨) .كانت قيم الـ (MICs) للدراسة الحالية بالنسبة لمضاد Ciprofloxacin (٦٤) مايكروغرام/مل ، وهذه تتفق مع دراسة اجريت على بكتريا *P. aeruginosa* حيث وجدوا قيمة MIC اكبر من (٣٢) مايكروغرام/مل[22]. كانت اقل مدى مقاومة لمضاد Imipenem حيث بلغت قيمة الـ (MICs) له (١٦≤) مايكروغرام/مل. وجد [23] وجماعتها من قيم عالية لمضاد Imipenem حيث بلغت (١٦-٦٤) مـايكروغرام/مل. أشار[24]في دراسة تأثير التركيز المثبط الادنى لمضاد Ciprofloxacin لوحده أو بخلطه مع N-acetyl Cysteine بوجود Sodium Salicylate او بعدم وجوده . أن استعمال التركيز المثبط الأدنى MIC أو 1/2MIC أو 1/4MIC أو 1/8MIC يثبط تكوين

الغشاء الحيوي بنسبة (٧٤.٣٦ و ٦٩.٥٥ و ٥٢.٤١ و ٤٢.٣٧) % على التوالي، وكذلك يثبط اعادة تكوين الغشاء الحيوي مما يقلل التصاق البكتريا على انابيب قسطرة المجاري البولية اما في حالة خلطه مع N-acetyl Cysteine فتزداد فعالية المضاد في تثبيط تكوين الغشاء الحيوي وتقليل التصاق البكتريا على وحدات القسطرة، مما يدل على ان قيم التركيز المثبط الادنى MIC لمضاد Ciprofloxacin تكون عالية. لقد أكدت العديد من الدراسات المحلية ازدياد مقاومة البكتريا للعديد من المضادات الحيوية وجاءت هذه الزيادة من المقاومة كنتيجة للممارسة الطبية الخاطئة في وصف المضادات الحيوية ولا توجد ضوابط او سياقات عمل عملية تحد من هذه الظاهرة اذ يمكن للمريض ان يحصل على اي مضاد حيوي من الصيدلية من دون وصفة طبية .

جدول (5) قيم MICs لعزلات *P. aeruginosa* لمضادات (Amikacin، Ciprofloxacin Imipenem ، Ceftazidime،Ceftriaxone)

رقم العزلة	IMP Imipenem مايكروغرام/مل	CAZ Ceftazidime مايكروغرام/مل	CRO Ceftriaxone مايكروغرام/مل	CIP Ciprofloxacin مايكروغرام/مل	AK Amikacin مايكروغرام/مل
1	١٦	٦٤	١٢٨	٦٤	٢٥٦
2	١٦	٦٤	٦٤	٦٤	٥١٢
3	-	٦٤	١٦	-	١٦
4	-	٥١٢	٢٥٦	-	٥١٢
5	-	٣٢	٥١٢	-	-
6	-	٤	١٢٨	-	-
7	٨	٢٥٦	٦٤	-	٦٤
8	-	٢٥٦	٢٥٦	٦٤	١٢٨
9	-	٦٤	٥١٢	٦٤	٥١٢
10	-	٥١٢	١٢٨	٦٤	-
11	-	٥١٢	٥١٢	-	٥١٢
12	-	٢٥٦	١٢٨	-	-

تم تحديد قيم التراكيز المثبطة الدنيا (MICs) لثلاثة انواع من المطهرات استعملت في هذه الدراسة (Povidin – Iodine، Chloroxylenol (Dettol) وFormalin) كونها شائعة الاستخدام في عمليات التطهير والتعقيم. الجدول(6) يوضح التراكيز المثبطة الدنيا للمطهرات الثلاثة المذكورة أعلاه على العزلات البكتريا المنتجة للغشاء الحيوي. يلاحظ ان قيم الـ (MICs) لمطهر الفورمالين كانت أوطئ مقارنة بتراكيز المطهرين المستخدمين في هذه الدراسة.اذ تراوحت قيم (MICs) لبكتريا *P. aeruginosa* ما بين (٥١٢- ٢٠٠٠) مايكروغرام/مل، اما قيم (MICs) الكلوروزايلينول (الديتول) كانت اعلى مقارنة بالمطهر السابق. اذ تراوحت قيم (MICs) مابين (٥١٢ – ٣٥٠٠) مايكروغرام/مل، عزلة واحدة فقط حدد اعلى تركيز لهذا المطهر اذ بلغ (٣٥٠٠) مايكروغرام/مل، هذه النتيجة لا تتوافق مع ما توصل الية [24] بأن قيم الـ (MICs) لمطهر لكلوروزايلينول قد تراوحت مابين (٢٥٦- ١٥٠٠) مايكروغرام/مل.

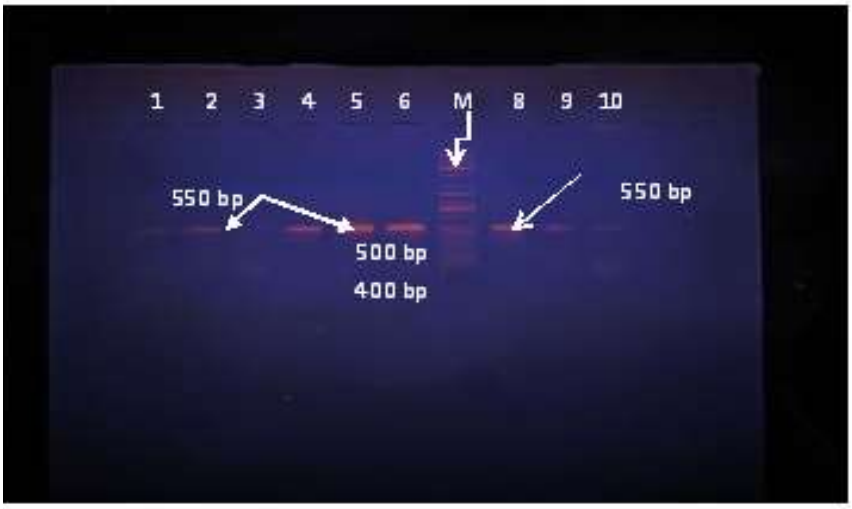
اما قيم الـ (MICs) لمحلول اليود فكانت قيمتها اعلى بكثير مقارنة بالمطهرين السابقين فقد تراوحت مابين (١٠٢٤- ٤٠٠٠) مايكروغرام/مل. ان هذه النتيجة تتوافق جزئيا الى ما توصل اليه [24] حيث تراوحت قيم الـــ (MICs) لمطهر Povidin – Iodine مابين (١٠٢٤- ٢٥٠٠) مايكروغرام/مل.

اشارة كل من [25] و[26] الى ان الخلايا في الاغشية الحيوية تظهر مقاومة عالية ومتميزة للمطهرات (disinfectants) والمضادات الحيوية, لذلك ارتبط بنشوء أخماج التهاب بعض الاعضاء بقدرة الجراثيم على تكوين الغشاء الحيوي.

جدول (6) قيم الـ (MICs) لثلاثة أنواع من المطهرات على عزلات *P. aeruginosa* المنتجة للغشاء الحيوي

العزلات	تركيز المطهر (مايكرو غرام / مل)											
	١٦	٣٢	٦٤	١٢٨	٢٥٦	٥١٢	١٠٢٤	١٥٠٠	٢٠٠٠	٢٥٠٠	٣٠٠٠	٣٥٠٠	٤٠٠٠
	Povidin - Iodine				Dettol					Formalin			
١	٢٠٠٠				٣٠٠٠					٢٠٠٠			
٢	٣٠٠٠				٣٠٠٠					١٠٢٤			
٣	١٠٢٤				١٥٠٠					١٠٢٤			
٤	٢٥٠٠				١٠٢٤					٥١٢			
٥	٣٠٠٠				٢٠٠٠					٢٠٠٠			
٦	١٥٠٠				٣٥٠٠					٢٠٠٠			
٧	٢٠٠٠				١٠٢٤					٥١٢			
٨	٣٥٠٠				٥١٢					١٠٢٤			
٩	١٠٢٤				٥١٢					١٠٢٤			
١٠	٢٠٠٠				١٠٢٤					١٠٢٤			
١١	٤٠٠٠				١٥٠٠					١٥٠٠			
١٢	٢٥٠٠				١٥٠٠					١٠٢٤			

أجريت التفاعلات التضاعفية لسلسلة الدنا (PCR) لعزلات بكتريا *P. aeruginosa* المقاومة لمعظم المضادات المستخدمة في هذه الدراسة والبالغ عددها (١٢) عزلة بالاعتماد على نتائج الـ (MICs) لكل عزلة . هذا النظام من الانظمة السهلة والسريعة لتشخيص البكتريا، وبواسطة هذا النظام أكدت بان هذه العزلات تعود الى بكتريا *P. aeruginosa* ، أظهرت النتائج ان جميع العزلات اعطت نتيجة سالبة للكشف عن انزيم (Metallo-β-lactamase) بطريقة EDTA ، في حين اظهرت نتائج التفاعلات التضاعفية لسلسلة الدنا DNA (PCR) كما بينت النتائج سالبة لكل من جين bla_{TEM}, bla_{SHV} ، بينما (٨) عزلات من بكتريا *P. aeruginosa* ’موجبة لجين bla_{CTX-M} كما موضح في شكل (4) .البكتريا المنتجة لانزيمات β-lactamase واسعة الطيف (ESBL) غالبا ما تكون مقاومة للعوامل المضادة المايكروبية الاخرى مثل aminoglycosides, , Tetracyelin ، Trimethaprim ، بالاضافة الى العديد من الجينات المقاومة التي تشفر على نفس البلازميد المرافق لانزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBL والتي غالبا ماتشفر كروموسوميا . اوضحت دراسة اجراها [27] ان طريقة الغليان كانت الافضل في اعطاء النتائج بالمقارنة مع استخدام قالب البلازميد لتحديد جينات ESBL ،وتعتبر طريقة الغليان من الطرق الروتينية الشائعة ،من جانب اخر تعتبر طرق التنميط المظهري phenotypic methods غير قادرة على التمييز بين الانزيمات النوعية او المتخصصة المسؤولة على انتاج انواع انزيمات β-lactamase واسعة الطيف(CTX-M,TEM,SHV).العديد من الابحاث او المصادر المختبرية تستعمل طرق التنميط الجيني لغرض تحديد الجين النوعي المسؤول على انتاج انزيمات ESBL والقادرة على تحديد المستوى الواطى من المقاومة (والتي يمكن ان تفتقد بالطرق المظهرية)،الاكثر من ذلك التحليل الجزيئي غالبا ما يكون عمله اقوى وبشكل مباشر على العينات السريرية وبدون زرع البكتريا وبالتالي يؤدي الى اختزال وقت الفحص[28]. تكتسب افراد البكتريا السالبة لصبغة كرام مقاومة لمجموعة مضادات β-lactam واسعة الطيف بواسطة ميكانيكيات مختلفة واحدة من أهم هذه الميكانيكيات هو البلازميد الذي يشفر الى مقاومة انزيمات البيتالاكتاميز ESBL و Ampc.



شكل (4): الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل (PCR) لبكتريا *P. aeruginosa* والمقاومة للعديد من المضادات باستعمال بوادئ نوعية لجين bla_{CTX-M} على هلام الاكاروز بتركيز ١% وفرق جهد ٧ فولت/سم
المسار M:الدليل الحجمي(١٠٠bp DNA Ladder)
المسار(١٠,٩,٨,٦,٥,٤,٣,٢,١):ناتج عملية التضخيم لجين دنا العزلات(١٢,١١,١٠,٧,٥,٤,٢,١) بالتعاقب

المصادر

[1] Brooks,G.F. ; Butel, J. S. and Morse, S.A.(2004). Alange Medical Book. Jawetz, Melnic and Adelberg,s , Medical Microbiology. 23rd ed. McGraw Hill Companies, United States.
[2] Todar, K. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* . *J. of Bacteriol*. 22(6) : 330- 355.
[3] Sharma, J.; Ray, P. andSharma, M. (2010). Plasmid profile of ESBL producing Gram-negative bacteria and correlation with susceptibility to β-lactam drugs. Indian. J. Pathol. Microbiol. 1(53): 83-86.
[4] Woodford N. Biological counterstrike: Antibiotic resistance mechanisms of gram-positive cocci. *Clin Microbiol Infect*. (2005); 11 Suppl 3: 2-21.
[5] Shumugaperumal, T. (2010). "Biofilm Eradication and Prevention, A Pharmaceutical Approach to Medical Device Infections ". A John Wiley and Sons, Inc., Publication, Hoboken, New Jersey. pp. 4-5.
[6] Mariana, N. S. ; Salman, S. A.; Neela, V. ; and Zamberi, S. (2009). Evaluation of modifiedcongo red agar for detection of biofilm produced by clinical isolates of methicillin-resistace *Staphylococcus aureus*. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 3(6), 330-338.
[7] Khan, F. ; Shukla, I. ; Rizvi, M. ; Mansoor, T. ; and Sharma, S. C. (2011). Detection of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* .Does it have a role in treatment of MRSAinfections ?. *Trends in Med. Res. Academic J.*, 6(2), 116-123.
[8] Hassan,A. ; Usman,J.; Kaleem, F. ; Omair, M. ; Khalid, A. ; and Iqbal, M. (2011). Detection and antibiotic susceptibility pattern of biofilm producing gram positive and gram negative bacteria isolated from a tertiary care hospital of Pakistan. *Malaysian J. Microbiol.*, 7(1), 57-60.
[9] Al-Jebouri, M. M.,(1989) . The effect of sub-lethal concentration of disinfectants on the antibiotic resistance patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Hosp. Infect.,* Vol. 14: pp.14-18.
[10] Eftekhar ,F.and Adaei, T. (2011). Biofilm formation and detection of Ica AB genes in clinical isolales of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* .Iranian, *J. Basic. Med. Sci*. 14(2):132-136.
[11] Clinical and Laboratory Standards Institute . (2012). Performonance standareds for antimicrobial testing .Twenty-Second information supplemenet .M100 -S22 .Vol, 32 .No.3 Replace M100-S21 vol,31 .No.1.

[12]الفرطوسي، هناء فرحان عباس (٢٠٠٢). تحديد المحتوى الجيني ودراسة تاثير بعض العوامل الكيمياوية والفيزيا ئية على ضمات الكوليرا المعزولة محليا. رسالة ماجستير .كلية العلوم .الجامعة المستنصرية .

[13] Sederi,H.; Karimi,Z.;Owlia,P.; Bahar,M.A.; and Rad,S.M.(2008).Phenotypic detection of metallo-beta-lactamase producing *Psudomonas aeruginosa* isolatefrom burned patients. *Iran. J. Pathol.* 3(1):20-24.

[14] Mirzaee, M; Owlia, P and Mansouri, S. (2009). Distribution of CTX-M β-lactamase genes among *Escherichia coli* strains isolated from patients in Iran. *Labmedicine.* 40: 724 -727.

[15] Ruppé, E.; Hem, S.; Lath, S.; Gautier, V.; Ariey, F.; Sarthou, J.L.; Monchy, D. and Arlet, G. (2009). CTX-M β-Lactamases in *Escherichia coli* from community-acquired Urinary Tract Infections, Cambodia. *Emerg Infect Dis.* 15(5):741-8.

[16] Seif El-Din, S. S. ; El-Rehewy, M. S. ; Ghazaly, M. M. ; and Abd-Elhamid, M.H.(2011). Biofilm formation by blood stream Staphylococcal isolates from febrile pediatric cancer patients at south Egypt cancer institute. *J. American Sci.* 7(1), 674-686.

[17] Mariana, N. S. ; Salman, S. A.; Neela, V. ; and Zamberi, S. (2009). Evaluation of modified congo red agar for detection of biofilm produced by clinical isolates of methicillin resistance *Staphylococcus aureus*. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 3(6), 330-338.

[18] Nagaveni,S.,Rajeshwari,H.,Kumar,A,Patil,S.A. and Chardrakanth,R.K(2010) Evaluation of biofilm forming ability of the multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*.5(4):563-566.

[19] García, C.; Horna, G.; Linares, E.; Ramírez, R.; Tapia, E.; Velásquez, J.; Medina, V.; Guevara, J.; Urbina, M.; Zevallos, S.; Espinoza, N.; Samalvides, F. and Jacobs, J. (2012). Antimicrobial Drug Resistance in Peru. *J. Emerg. Infect. Dis.* 3(18).

[20] Ranjbar, R.; Owlia, P.; Saderi, H.; Mansouri, S.; Jonaidi-Jafari, N.; Izadi, M.; Farshad, S. and Mohammad Arjomandzadegan, M. (2011). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Burned Patients Hospitalized in a Major Burn Center in Tehran, Iran. *Acta. Medica. Iranica.* 49(10): 675-679.

[21] Fritsche, T.R.; Castanheira, M.; Miller, G.H.; Jones, R.N. and Armstrong, E.S. (2008). Detection of Methyltransferases Conferring High-Level Resistance to Aminoglycosides in Enterobacteriaceae from Europe, North America, and Latin America. *J. Antimicrob. Agents Chemother.* 5(52): 1843–1845,

[22]Wydemuch,Z.,Ciolek,O.S.,Cholewa,K.,Mazurek,U.,Pacha,J.,Kepa,M.,Idzikk,D.and Wojtyczka,R.D.(2005).gyrA Mutations in ciprofloxacin- resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in asilesian ,Hosiptal in Polish J.of Microbial.54(3):201-206.

[23] Shazad , M., Yigong, G. and David, M. (2003). Doripenem versus *Pseudomonas aeruginosa* In vitro. Activity against characterized isolates, Mutants, and Transconjugants and Resistance selection Potential. *J. Antimicrobia. Agents chemotherapy* . 48(8): 3086-90.

[24] Abd El-Aziz , A.A.; El-Banna, T.; Sonbol, F.I.; Abo-Kamar, A. and Seif-Eldin , D.W. (2012) . Evaluation of the combination of N-acetyl cystein and or Sodium Salicy late biofilm formation on Urinary catheters. Journal of antimicrobial agents. Vol.2. no.1:4.

[25]حنا ،صفا توما .(١٩٩٩) . دراسة على الجراثيم الهوائية الملوثة لردهات احدى المستشفيات ومقاومتها لمضادات الحياة والمطهرات. رسالة ماجستير. كلية العلوم .الجامعة بغداد.

[26] Tompkin,R.B.(2002).Control of *Listeria monocytogenes* in the food .processing environment,J.Food,Protect,65:709-725.

[27]Gurung,J.;Khyriem,A.B.;Bannik,A.;Lyngdoh,W.V.;Choudhury,B.and Bhattachayya,P.(2013).Association of biofilm production with multidrug resistance among clinical isolates of Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa from intensive care unit.Indian,J.Crit.care Med.,17(4):214-218.

[28] Al-Kaabi, M.H. (2011). Detection of TEM and extended spectrum β-lactamase enzymes produced by some Gram negative bacteria using polymerase chain reaction. M. Sc. Thesis. College of Science .Al-Mustansiryah University.

[29] Branger, C.; Zamfir, O.; Geoffroy, S.; Laurans, G.; Arlet, G.; Thien, H.V.; Gouriou, S.; Picard, B. and Denamur, E. (2005). Genetic Background of *Escherichia coli* and Extendedspectrum β-Lactamase Type. *Emerg. Infect. Dis*. 1(11):54-61.