التحري عن إنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف في العزلات السريرية لبكتريا الزوائف الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* في النجف

الهام جواد كاظم   علي محسن المحنة

كلية التربية للبنات / جامعة الكوفة   كلية الطب / جامعة الكوفة

الخلاصة

تم جمع 142 عينة سريرية لغرض التحري عن بكتريا *Ps. aeruginosa* ودراسة مقاومتها للمضادات الحيوية، وقُسمت العينات بحسب مصادر جمعها إلى مجموعتين (102 عينة إدرار و40 مسحة حروق)، أظهرت النتائج عائديه 37 عزلة (10عزلات من الإدرار و27 عزلة من مسحات الحروق) لبكتريا *Ps. aeruginosa*. اختبرت حساسية عزلات *Ps. aeruginosa* تجاه 16 نوع من المضادات الحيوية فكانت جميعها مقاومة على الأقل لثلاثة أصناف من المضادات الحيوية لذلك اعتبرت متعددة المقاومة . تم التحري عن قابلية هذه العزلات على إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف[(ESBLs) Extended-spectrum-β-lactamase] من خلال الكشف المظهري باستخدام فحص الأقراص المزدوجة ألتآزري، وكانت نتائج الفحص سالبة لجميع العزلات، كما تم التحري عن إنتاج إنزيمات ESBL من خلال الكشف عن تواجد مورثات bla_{TEM} و bla_{SHV} وbla_{CTX-M} و bla_{VEB} و bla_{PER} وbla_{GES} في العزلات باستعمال تقنية سلسلة تفاعل إنزيم البلمرة (Polymerase chain reaction). إذ أظهرت 20 (54%) و10 (27%) و4 (10.8%) عزلات احتوائها على المورثات bla_{SHV} و bla_{CTX-M} و bla_{TEM} على التوالي.

المقدمة

تعدّ *Ps. aeruginosa* مسببات مرضية انتهازية وتشكل خطراً حقيقياً للمرضى الراقدين في المستشفيات وبشكل خاص مرضى السرطان، وإصابات الحروق، ومرضى نقص المناعة، وزراعة الأعضاء فهي واحدة من أهم الأنواع البكتيرية المسببة للإصابة المكتسبة في المستشفيات (Greenwood *et al*., 2007).تعزى الإصابات ببكتريا *Ps. aeruginosa* إلى قدرتها على استعمار مواقع تشريحية مختلفة لامتلاكها آليات التصاق فعالة ومتطلبات تغذية قليلة ومقاومة للمضادات الحيوية ولها قدرة على غزو الأنسجة الموضعية وتحطيمها ولها ميل لغزو مجرى الدم وإحداث الأمراض الجهازية . (Zeng, 2004) تمتلك بكتريا *Ps. aeruginosa* القدرة على مقاومة مدى واسع ومتنوع من المضادات الحيوية ما جعلها من بين أخطر وأهمّ المسببات للأمراض التي تصيب الإنسان (Hsueh *et al*., 2005) ، إذ بإمكانها استخدام آليات متنوعة في المقاومة، ومن أهم هذه الآليات انخفاض نفاية الغشاء الخارجي، امتلاكها مضخات دفق متعددة العقاقير، أو إنتاج إنزيمات محطمة للمضاد الحيوي مثل إنزيمات β-lactamases وإنّ انتشار هذه البكتريا في مختلف مناطق الجسم، وتعرضها المستمر لمضادات الحياة، أدّى إلى نشوء سلالات تمتاز بصفة تعدد المقاومة للعقاقير(Greenwood *et al*., 2007).يعد إنتاج إنزيماتESBL من أهم آليات المقاومة التي تم اكتشافها في العصيات السالبة لصبغة غرام. وقد أُجريت كثير من الدراسات لهذه الإنزيمات، وخصوصاً التي تتعلق بالعوامل الوراثية التي تسيطر على إنتاجها، فوجد إنّ الجينات التي تشفر لهذه الإنزيمات محمولة أمّا على كروموسومات، أو على بلازميدات، وأحيانا توجد على العوامل القافزة (Transposons) (Jacoby and Bush, 2009)، وبسبب ارتفاع نسبة مقاومة بكتريا *Ps. aeruginosa* لمعظم المضادات الحيوية المستخدمة في الوقت الحاضر، ولوجود دراسات قليلة حول إنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف في العراق بشكل عام وفي محافظة النجف بشكل خاص، وخصوصاً في مجال الدراسة الجزيئية مع المقاومة المتسارعة لهذه البكتريا، ارتأينا أن يكون هدف دراستنا هو معرفة انتشار هذه الإنزيمات في العزلات السريرية لبكتريا *Ps. aeruginosa*.

المواد وطرائق العمل

العزل والتشخيص : تم جمع 102 عينة إدرار و40 مسحة حروق من مستشفى الصدر التعليمي العام ومستشفى الزهراء التعليمي للولادة والأطفال في محافظة النجف للفترة من تشرين الثاني 2009 ولغاية شباط 2010 و شخصت عزلات الـ *Ps. aeruginosa*، بالاعتماد على كل من Collee *et al.* (1996) و MacFaddin (2000).

فحص الحساسية للمضادات الحيوية : اختبرت الحساسية الدوائية للعزلات البكتيرية بطريقة الأقراص اعتمادا على طريقة Bauer *et al.* (1966) وتم اختيار أنواع المضادات الحيوية اعتمادا على CLSI (2009) والمجهزة من شركة Bioanalyse (Turkey)، وتضمنت: البيراسيللين (100مايكروغرام)،

التايكارسلين (75 مايكروغرام)، السيفوكسيتين (30 مايكروغرام)، السيفتازيديم (30 مايكروغرام) ، السيفوتاكسيم (30 مايكروغرام)، السفترياكزون (30 مايكروغرام)، الاميبينيم (10 مايكروغرام)، الميروبنيم (10مايكروغرام)، الازتريونيم (30 مايكروغرام)، الاميكاسين (30 مايكروغرام)، الجنتاميسين (10 مايكروغرام)، التوبرامايسين (10 مايكروغرام)، السبروفلوكساسين (5 مايكروغرام)، النورفلوكساسين (10 مايكروغرام)، الليفوفلوكساسين (5 مايكروغرام)، والاموكسيكلاف (20مايكروغرام اموكسيسيلين+10مايكروغرام كلافولانيت).

التحري على إنتاج انزيمات ESBL

1. اختبار الأقراص المزدوجة التقريبي (Double disk approximation test)

استخدمت طريقة Coudron *et al.*1997 حيث أُخذت أقراص المضادات الحيوية (الازتريونام والسيفترياكسون والسيفتازيديم والسيفوتاكسيم)، ووضعت على مسافة 15ملم (من الحافة إلى الحافة) حول قرص مركزي من الأموكسيكلاف على أطباق مولرهنتون الصلب المزروع بالبكتريا وحضنت بدرجة 37˚م لمدة 18 ساعة إنّ امتداد منطقة التثبيط بين القرص المركزي وأحد مضادات البيتالاكتام تعطي دليلاً على كون البكتريا منتجة لأنزيمات ESBL.

2. تقنية سلسلة تفاعل إنزيم البلمرة (PCR)

تم استخلاص الـ DNA من الخلايا البكتيرية باعتماد عدة Wizard Genomic DNA (Promiga,USA) أما البادئات المستخدمة (Alpha DNA, Montreal) فموضحة في الجدول (1). استخدم جهاز الدورات الحرارية PCR (GeneAmp thermal cycle, Singapore) لتضخيم التسلسلات الوراثية المدخلة لبادئات DNA، وحُضّر مزيج PCR بأخذ حجم 12.5 مايكروليتر من محلول المزيج الأخضر الرئيس(Promiga) بتركيز نهائي يساوي (1x) و5 مايكروليتر من مستخلص DNA، إذ استُخدم كقالب (Template)، ولغرض الحصول على تركيز نهائي يساوي 40 بيكامول/مايكروليتر، لكل باديء أضيف 2.5 مايكروليتر للبادئ الأمامي (بتركيز يساوي 16 بيكامول/مايكروليتر) و 2.5 مايكروليتر (من 16 بيكامول/ مايكروليتر) للبادئ العكسي وأكمل الحجم إلى 25مايكروليتر بالماء الخالي من الإنزيم المحلل. وضبطت ظروف سلسلة تفاعل البلمرة لكل البادئات كما يلي: المسخ الأولي (دورة واحدة) 94˚م/3 دقائق ثم 35 دورة تتضمن المسخ (94˚م/30 ثانية) والتثبيت (57˚م/30 ثانية) والاستطالة (72˚م/دقيقة واحدة) وأخيرا الاستطالة النهائية (دورة واحدة) 72 ˚م/7 دقائق. رُحّلت النواتج على هلام الاگاروز (1%). الأحزمة (Bands) تم توضيحها باستخدام UV-transilluminator بعد التصبيغ ببروميد الاثيديوم.

جدول (1) بـادئـات DNA (DNA primers)

اسم البادئ		تسلسل القواعد النيتروجينيه	حجم	المصدر
*bla*TEM	F	5-AAACGCTGGTGAAAGTA-3	822bp	Hujer *et al.*, 2006
	R	5-AGCGATCTGTCTAT-3		
*bla*SHV	F	5-	753bp	Hujer *et al.*, 2006
	R	5-		
*bla*CTX-M	F	5-CGCTTTGCGATGTGCAG-3	550bp	Bhattacharjee *et al.*, 2007
	R	5-ACCGCGATATCGTTGGT-3		
*bla*GES	F	5-	846bp	Kiratisin*et al.*,
	R	5-		
*bla*PER	F	5-AGTCAGCGGCTTAGATA-3	978bp	Wang *et al.*, 2006
	R	5-CGTATGAAAAGGACAAT-3		
*bla*VEB	F	5-GCGGTAATTTAACCAGA-3	961bp	Wang *et al.*, 2006
	R	5-GCCTATGACCAGTGTT-3		

النتائج

تم الحصول على 37 (26%) عزلة *Ps. aeruginosa* تضمنت 10(9.9%) عزلات من عينات الإدرار و 27 (67.6%) عزلة من عينات الحروق. اختبرت حساسية هذه العزلات تجاه عدد من أصناف المضادات الحيوية (جدول 2)، وبينت النتائج إن هنالك مقاومة عالية نسبيا لمضادات البيتالاكتام والمتمثلة بالبنسيلينات مثل مضادي التايكرسيلين والبراسيللين إذ جاءت نسب المقاومة لهما (81%) و(91%) على التوالي وللجيل الثالث من السيفالوسبورينات المتمثلة بالسيفترياكسون والسيفتازيديم (94.5%) لكل منهما و للسيفوتاكسيم (86.4%). إن أعلى نسبة مقاومة أبدتها عزلات *Ps. aeruginosa* كانت لمضاد الاموكسيكلاف (94.5%). كانت نسبة مقاومة العزلات قيد الدراسة للمضاد الحيوي الاميكاسين (27%) بينما اظهرت مقاومة مرتفعة نسبيا لكل من المضادين الجنتامايسين والتوبراميسين (72%) و(64%) على التوالي أما مضادات السبروفلوكساسين والنورفلوكساسين والليفوفلوكساسين فقد أظهرت فعالية متوسطة ضد عزلات *Ps. aeruginosa* إذ كانت نسب المقاومة (15%) و(37.8%) و(21.6%) على التوالي. أظهرت جميع العزلات حساسية بنسبة (100%) لمضاد الاميبينيم بينما كانت (70%) منها مقاومة للميروبينيم. يتضح من النتائج في جدول (2) إن العزلات التي مصدرها عينات الإدرار كانت حساسة بنسبة (100%) لمضادات الاميبينيم والاميكاسين والتوبراميسين والسيبروفلوكساسين والليفوفلوكساسين والنورفلوكساسين.

جدول (2) توزيع النسب المئوية للمقاومة تجاه مضادات الحياة لعزلات *Ps. aeruginosa* وفق مصادر عزلها

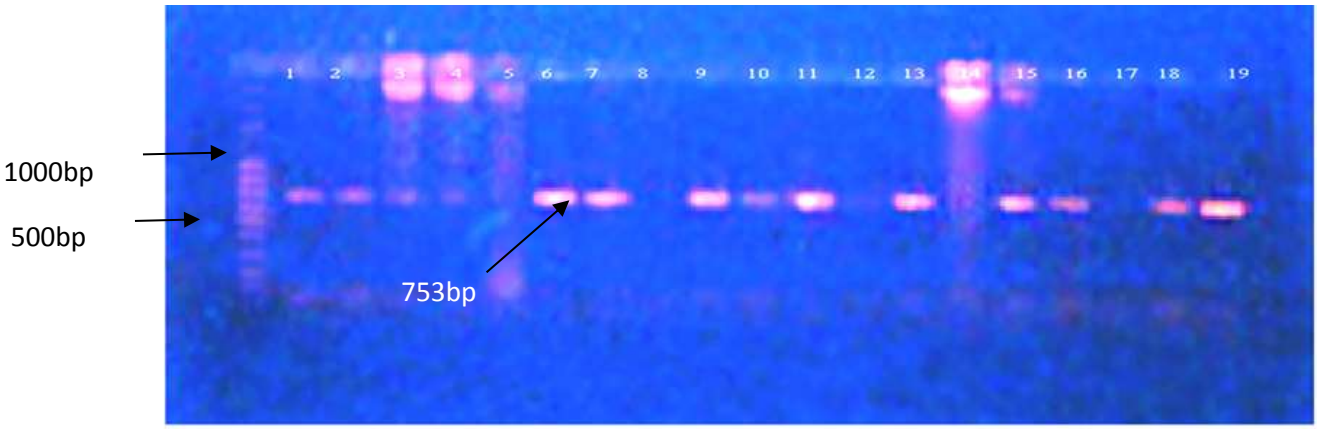
المضادات الحيوية	عدد العزلات المقاومة (%)		العدد الكلي للعزلات المقاومة (%)
		حروق(27 عزلة)	
التايكارسلين	25(92.6)	5(50)	30(81.1)
البراسيللين	25(92.6)	9(90)	34(91.9)
السيفوكسيتين	3(11.1)	1(10)	4(10.8)
السيفوتاكسيم	23(85.2)	9(90)	32 (86.5)
السفترياكزون	27(100)	8(80)	35(94.6)
السيفتازيديم	26(96.3)	9(90)	35(94.5)
الازتريونيم	25(92.6)	8(80)	33(89.2)
الاموكسيكلاف	26(96.3)	9(90)	35(94.6)
الاميكاسين	10(37)	0(0.0)	10(27)
الجنتاميسين	24(88.9)	3(30)	27(73)
التوبراميسين	23(85.2)	0(0.0)	23(62.2)
السبروفلوكساسين	20(74.1)	0(0.0)	20(54.1)
الليفوفلوكساسين	8(29.6)	0(0.0)	8(21.6)
النورفلوكساسين	14(51.9)	0(0.0)	14(37.8)
الاميبينيم	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
الميروبنيم	22(81.5)	4(40)	26(70.3)

جاءت نتائج اختبار فحص الأقراص المزدوجة التازري للكشف عن إنتاج إنزيمات ESBL سالبة لجميع العزلات (100%) قيد الدراسة.يوضح الجدول (3) توزيع المورثات المسؤولة عن المقاومة لمضادات البيتالاكتام واسعة الطيف في العزلات السريرية لبكتريا *Ps. aeruginosa*. وبينت النتائج أنّ 20 (54%) عزلة تمتلك المورث bla_{SHV} (شكل 1) بواقع 3 (30%) عزلات مصدرها عينات الإدرار و17(62.8%) عزلة مصدرها مسحات الحروق و 10(27%) عزلات تمتلك موروثاً bla_{CTX-M} وبواقع 5 (50%) عزلات من الإدرار و5 (18.5%) عزلات من الحروق (شكل 2) و 4 (10.8%) عزلات جميعها من عينات الحروق

أعطت ناتج للمورث bla_{TEM} (شكل 3). جميع العزلات لم تعطِ ناتج تضخيم للمورثات bla_{VEB} و bla_{GES} و bla_{PER}.

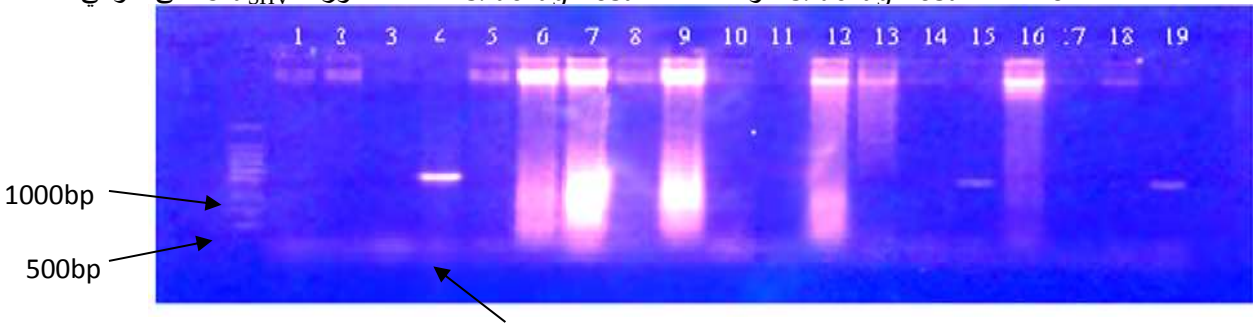
جدول (3) يبين تواجد ونسب التوزيع المورثات المسؤولة عن إنتاج أنزيمات ESBL في عزلات بكتريا *Ps. aeruginosa*

مصدر العزل	عدد العزلات	نسب توزيع المورثات					
		bla_{SHV}	bla_{CTX-m}	bla_{TEM}	bla_{VEB}	bla_{GES}	bla_{PER}
الإدرار	10	3(%30)	5(%50)	0(%0.0)	0(%0.0)	0(%0.0)	0(%0.0)
الحروق	27	17(%62.8)	5(%18.5)	4(%15)	0(%0.0)	0(%0.0)	0(%0.0)
المجموع	37	20(%54)	10(%27)	4(%10.8)	0(%0.0)	0(%0.0)	0(%0.0)

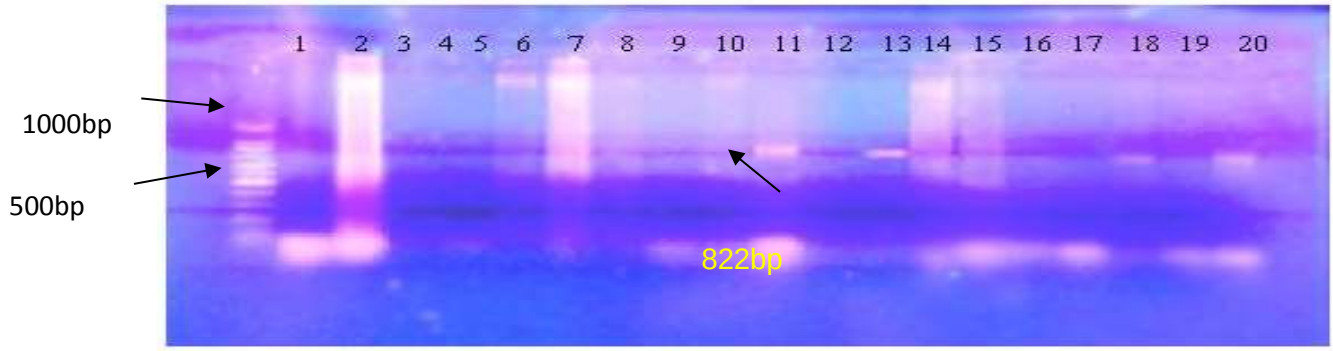


شكل (1): الترحيل الكهربائي لمورث bla_{SHV} المتضاعف باستخدام تقنية (PCR) لعزلات بكتريا *Ps. aeruginosa*.

المسار رقم (19,18,16,15,13,11,10,9,7,6,4,3,2,1) يشمل العزلات: *Ps. aeruginosa* PAU7 و *Ps. aeruginosa* PAU9 و *Ps. aeruginosa* PAB1 و *Ps. aeruginosa* PAU10 و *Ps. aeruginosa* PAB3 و *Ps. aeruginosa* PAB4 و *Ps.aeruginosa* PAB8 و *Ps. aeruginosa* PAB10 و *Ps. aeruginosa* PAB11 و *Ps. aeruginosa* PAB13 و *Ps. aeruginosa* PAB14 و *Ps. aeruginosa* PAB17 و *Ps. aeruginosa* PAB19 و *Ps. aeruginosa* PAB26 و *Ps. aeruginosa* PAB27 تمتلك المورث bla_{SHV} على التوالي



شكل (2): الترحيل الكهربائي لمورث bla_{CTX-M} المتضاعف باستخدام تقنية (PCR) لعزلات بكتريا *Ps. aeruginosa* . المسار رقم (17,15,14,10,4,2) وتشمل العزلات:*Ps. aeruginos* PAU1 *Ps. aeruginosa* PAU2 و*Ps. aeruginos* PAU3 *Ps. aeruginosa* PAB20 و*Ps. aeruginosa* PAB32 و*Ps. aeruginosa* PAB36 على التوالي تمتلك المورث bla_{CTX-M} أما بقية المسارات فتمثل عزلات لا تمتلك المورث bla_{CTX-M}.



شكل (3): الترحيل الكهربائي لمورث bla_{TEM} المتضاعف باستخدام تقنية (PCR) لعزلات بكتريا *Ps. aeruginosa* .

المسار رقم (20,18,13,11) ويشمل العزلات *Ps. aeruginosa* PAB11 و *Ps. aeruginosa* PAB20 و*Ps. aeruginosa* PAB22 و*Ps. aeruginosa* PAB32 على التوالي تمتلك المورث bla_{TEM} أما العزلات في بقية المسارات فتمثل عزلات لا تمتلك المورث bla_{TEM} .

المناقشة : بينت النتائج إن عزلات *Ps. aeruginosa* التي مصدرها عينات الإدرار كانت أكثر حساسية للمضادات الحيوية من العزلات التي مصدرها مسحات الحروق وهذه النتيجة قد تعود إلى كون اغلب عينات الإدرار قد تم أخذها لمرضى خارجيين غير راقدين في المستشفى ربما لم يسبق لهم تعاطي مثل هذه العلاجات بصورة متكررة بينما نجد إن العزلات التي مصدرها مسحات الحروق كانت اشد ضراوة وأكثر مقاومة للمضادات الحيوية المستعملة في هذه الدراسة لكون جميع العزلات قد جمعت لمرضى راقدين في المستشفى وهذا يشير إلى استيطان هذه البكتريا (وبالأخص السلالات الانتهازية التي تمتلك مقاومة متعددة لأغلب أنواع المضادات الشائعة) لمستشفيات محافظة النجف بشكل يدعو إلى القلق ويحتاج للكثير من البحث والدراسة لأن انتشار مثل هذه العزلات سيؤدي بالنتيجة إلى فشل العلاجات المتوفرة حاليا ومن ملاحظة نتائج الدراسة نجد إن أكفا المضادات الحيوية ضد الإصابات التي تسببها هذه البكتريا هي الاميبينيم والاميكاسين وليفوفلوكساسين وهذا يتوافق مع نتائج عدد من الباحثين بوصف هذه المضادات علاجاً فعالاً ضد بكتريا *Ps. aeruginosa* ((Hauser and Padman, 2005; Japoni *et al.*, 2009). أوضحت الدراسة إن جميع العزلات لم تعطي نتيجة ايجابية في اختبار الأقراص المزدوجة التازري وهذا يعطينا دليلاً على عدم دقة ومدى صعوبة إجرائه للكشف عن تواجد إنزيمات ESBL لعزلات *Ps. aeruginosa* وذلك يرجع إلى أسباب عديدة منها إنّ هذا الاختبار قد يعطي نتيجة سالبة خاطئة ربما لكون العزلات قيد البحث تمتلك تعبيراً جينياً جوهرياً محفزاً لإنزيم AmpC الكروموسومي إذ من الممكن أن يؤدي تواجد مضادات السيفوتاكسيم والسيفتازيديم إلى تحفيز هذه البكتريا على الإنتاج الفائق لإنزيم AmpC الكروموسومي ومن المعروف عن هذا الإنزيم عدم تأثره بالكلافولانيت (Weldhagen, 2004). أو ربما تمتلك إنزيمات البيتالاكتاميز المعدنية العائدة للصنف B والتي لا تتأثر أيضا بالفعل المثبط لمضادات البيالاكتاميز التعاضدية مثل الكلافولانيت (Jacoby and Bush, 2009). بالإضافة إلى عوامل أخرى، ومنها إنّ هذه البكتريا تمتلك غشاءً خارجياً ذو نفاذية أقل بكثير من أفراد العائلة المعوية، وكذلك المقاومة التي تصنعها مضخات الدفق الخارجي، وقد تكون المقاومة ناتجة عن هذه العوامل منفردة أو مجتمعة وهذا ما أكده (Levermor , 2001) و(Weldhagen, 2004). بينت الدراسة أنّ نسبة تكرار المورث bla_{SHV} هي الأعلى بين عزلات *Ps. aeruginosa* ، وقد يعود السبب في ذلك ربما إلى كون هذه البكتريا متواجدة بصورة مستمرة مع أنواع البكتريا السالبة لصبغة غرام الأخرى، والتي تتواجد فيها إنزيمات TEMوSHV ذات الطيف الواسع بشكل رئيسي مثل بكتريا *Escherichia coli* و *Klebsiella pneumoniae*، وهذا يؤكد أنّ الانتقال الأفقي للعناصر الوراثية بواسطة العناصر المتنقلة، مثل البلازميدات والمورثات القافزة وكاسيتات المورث قد أثّر تأثيراً كبيراً في الانتشار السريع والواسع للمورثات المسئولة عن

مقاومة المضادات الحيوية بين تلك الأنواع وهذا ما أكده Nordman (1993)، ولهذا السبب نجد أيضا أنّ عزلات هذه البكتريا التي حصلنا عليها من إصابات الحروق قد أظهرت تواجداً لإنزيم SHV ضعف تواجده في العزلات التي تم الحصول عليها من عينات الإدرار، وهذا ربما يعود إلى كون العزلات في حالات الحروق جمعت لمرضى راقدين في المستشفى، الأمر الذي يؤكد كون بكتريا *Ps. aeruginosa* هي إحدى المسببات المرضية للإصابات الخاصة بالمستشفيات، مما سهل عملية انتقال تلك المورّثات من مريض إلى آخر (Livermor, 2002). وفي دراسة ذات صلة أُجريت في اليونان تمكن Poirel *et al.* (2002) من عزل 7عزلات *Ps. aeruginosa* منتجة للإنزيم SHV-5 من مستشفيات أثينا واليونان مابين سنة 1998 وسنة 2002، وقد أشارت نفس الدراسة إلى أنّ هذا المورّث ينتشر بشكل واسع في عزلات العائلة المعوية في مستشفيات اليونان، لهذا فإنّ إنزيمات ESBLعندما تكون منتشرة بكثرة بين البكتريا المعوية، فهذا يُعدّ مصدراً للمقاومة المكتسبة في بكتريا *Ps. aeruginosa* (Livermore and Paterson, 2006). وقد جاءت نتائج الدراسة الحالية مخالفة لدراسة أجريت في الصين من قبل Jiang *et al.* (2006) والتي أشارت إلى أنّ نسبة تكرار إنزيم SHV بين 75عزلة سريريه كانت 0.0%. اظهر ت الدراسة تواجد المورث الذي يشفر لإنزيم CTX-M بنسبة27% من عزلات *Ps. aeruginosa* وهذه الإنزيمات من أكثر أنواع إنزيمات البيتالاكتاميز المكتشفة خلال السنوات الأخيرة تردداً وخصوصاً في أوربا وأقطار جنوب أمريكا، وتختلف أنواع إنزيمات CTX-M باختلاف المدن فمجموعة إنزيمات CTX-M-9 وCTX-M-14 سائدة في أسبانيا، بينما إنزيمات المجموعة الأولى وخصوصاً CTX-M-3 وCTX-M-15 سائدة في فرنسا والمملكة المتحدة وكذلك وُجد الإنزيم CTX-M-15 سائداً في لبنان والكويت (Bonet *et al.*, 2001) . وقد كانت نتائج الدراسة الحالية التي كشفت عن تواجد إنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف نوع CTX-M في عزلات لبكتريا *Ps. aeruginosa* حصلنا عليها من مستشفيات محافظة النجف هي الأولى من نوعها في المحافظة، إذ إنّ اكتشاف هذه الإنزيمات في عزلات *Ps. aeruginosa* ربما يكون بسبب التواجد ألدائمي لسلالات هذه البكتريا مع سلالات البكتريا المعوية التي تُعدّ المصدر الرئيسي لهذه الإنزيمات، كما إنّ انتشار هذه الإنزيمات ربما يصبح سهلاً بواسطة البلازميدات والعناصر المتنقلة الأخرى، إنّ لهذه المعلومات أهمية في المختبرات السريرية التي تفتقر إلى التعرف على هذا الإنزيم في البكتريا السالبة لصبغة كرام، مما يعرض العلاج بالمضادات الحيوية للفشل، وإنّ هذه النتائج تؤكد أنّ *Ps. aeruginosa* ربما تصبح مصدراً كامناً لمورّثات CTX-M في النجف.بينت نتائج الدراسة الحالية إنّ (10.8%) من العزلات أعطت ناتج تضخيم للمورث bla_{TEM}، وهذا المورّث ينشأ نتيجة حصول طفرة وراثية في مورثات bla_{TEM} التقليدية تصبح على إثرها هذه الإنزيمات مقاومة لعدد من مضادات البيتالاكتام واسعة الطيف (Livermore, 2001).أظهرت الدراسة عدم تمكن (29.8%) من العزلات على إعطاء ناتج PCR لجميع المورثات قيد الدرس، وهذا ربما يعود إلى عدم امتلاك العزلات المختبرة للمورث المطلوب، أو وجود أنواع أخرى لا تشكل أهدافاً متخصصة للبادئات المستخدمة في هذه الدراسة. ويمكن أن نستنتج من هذه الدراسة ان عزلات *Ps. aeruginosa* كانت مقاومة لمعظم مضادات البيتالاكتام والمضادات الحيوية الأخرى كما أظهرت تقنية تفاعل إنزيم البلمرة قدرة بعض عزلات *Ps. aeruginosa* على إنتاج عدد من إنزيمات ESBL مما تشكل تحديا علاجيا في محافظة النجف لذلك يجب السيطرة على استخدام المضادات الحيوية وإجراء فحص الحساسية قبل إعطاء العلاج.

المصادر

Bauer, A. W.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J. C.; and Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. Amer. J. Clin. Pathol. 45: 493-496.

Bearzi, C., Edalucci, E., Gionechetti, F. and Rossolini G. M. (2004). Endemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with acquired metallo-betalactamase determinants in European hospital. Emerg. Infect. Dis. 10:535-538.

Bhattacharjee, A., Sen, M. R., Anupurba, S., Prakash, P. and Nath, G. (2007). Detection of OXA-2 group extended-spectrum β-lactamase-producing clinical isolates of *Escherichia coli* from India. J. Antimicrob. Chemother. Advance Access published July 10.

Bonnet, R. (2004). Growing group of extended-spectrum ß-lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrob. Agents Chemother., 48:1-14.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2010). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement. 30(1).

Collee, J. G., Fraser, A. G., Marmiom, B. P. and Simmon, A. (1996). Mackie and McCarteny, Practical Medical Microbiology. 4th ed. Churchill Livingstone inc., USA.
Coudron, P. E., Moland, E. S. and Sanders, C. C. (1997). Occurrence and detection of extended-spectrum β-lactamases in members of the family *Enterobacteriacea* at a Veterans Medical Center: seek and you may find. J. Clin. Microbiol., 35: 2593-2597.
Greenwood, D., Finch, R., Davey, P. and Wilcox, M. (2007). Antimicrobial chemotherapy. Oxford University Press, New York.
Hsueh, P. P., Chen, W. H. and Luh, K. T. (2005). Relationships between antimicrobial use and antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria causing nosocomial infections from 1991-2003 at a University Hospital in Taiwan. Int. J. Antimicrb. Agents, Nov. 6.
Hujer, K. M., Hujer, A. M., Hulten, E. A., Bajaksouzian, S., Adams, J. M., Donskey, C. J., Ecker, D. J., Massire, C., Eshoo, M. W., Sampath, R., Thomson, J. M., Rather, P. N., Craft, D. W., Fishbain, J. T., Ewell, A. J., Jacobs, M. R., Paterson, D. L. and Bonomo, R. A. (2006). Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* spp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter reed army medical center. Antimicrob. Agents Chemoth., 50: 4114-4123.
Jacoby, J. A. and Bush, K. (2009)."Amino acid sequences for extended-spectrum and inhibitor resistant ß-TEM, SHV and OXA lactamases.", from http://www.lahey.org/Studies/.
Jiang, X., Zhang, Z., Li, M., Zhou, D., Ruan, F. and Lu, Y. (2006). Detection of extended-spectrum β-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother., 50: 2990-2995.
Kiratisin, P., Apisarnthanarak, A., Laesripa, C. and Saifon, P. (2008). Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum-β-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates causing health care-associated infection in Thailand, Where the CTX-M family. Antimicrob. Agents Chemother., 52: 2818-2824.
Lagatolla, C., Tonin, E. A., Monti-Bragadin, C., Dolzani, L., Gombac, F.,
Livermore, D. M. (2001). Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Clin. Infect. Dis., 34: 634-640.
Livermore, D. M. and Paterson, D. L. (2006). Pocket guide to extended-spectrum β-lactamases in resistance. Curr. Med. Group Ltd., London.
Livermore, D.M. (2001). Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. J. Antimicrob. Chemother., 47: 247-250.
MacFaddin, J. F. (2000). Biochemical tests for identification of medical bacteria 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins, USA.
Nordmann, P., Ronco, E., Naas, T., Duport, C., Michael-Briand, Y. and Labia, R. (1993). Characterization of a novel extended-spectrum β-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother., 37 (5): 962-969.
Poirel, L., Ronco, E., Naas, T. and Nordmann, P. (2002). Extended-spectrum ß-lactamase TEM-4 in *Pseudomonas aeruginosa*. Clin. Microbiol. Infect., 5: 651-652.
Wang, C., Cai, P., Chang, D. and Mi, Z. (2006). A *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum β-lactamase J. Antimicrob. Chemother. Advance Access publication 14 April.
Weldhagen, G. F. (2004). "Integrons and β-lactamases-a novel perspective on resistance." Intra-pleural pressure. J. Antimicrob. Agents, 23: 556-562.

Zeng, L. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity and antibiotic resistance. Doctor of Philosophy, University of Florida.

Abstract: One hundred and forty tow clinical specimens were collected to evaluate the occurrence and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. Depending on the source of collection, specimens were divided into 102 urine and 40 burn specimens. A total of 37 isolates were obtained (10 from urine and 27 from burn specimens). Antibiotic susceptibility testing was performed on all *Ps. aeruginosa* isolates against 16 commonly used antibiotics. All of these isolates were found to be resistant to the more than three classes of antibiotics which were subjected. Therefore, these isolates were considered to be multidrug resistant. The isolates were further characterized for their extended-spectrum β-lactamases (ESBLs) production by phenotypic method (Double disk approximation test), all of the isolates were negative for this test. The isolates were then examined for the presence of the bla_{TEM}, bla_{SHV}, $bla_{\text{CTX-M}}$, bla_{VEB}, and bla_{PER} by PCR assay. The results revealed that 20(54%), 10(27%), and 4(10%) of the isolates carried bla_{SHV}, $bla_{\text{CTX-M}}$, and bla_{TEM}, respectively.