تشخيص بكتريا *P. aeruginosa* من عينات سريريه وبيئية مختلفة باستخدام جين *16S* rDNA.

Identification of *Pseudomonas aeruginosa* From Clinical and environmental difference Specimen by Using *16S rDNA* Gene.

بلال علي عواد / كلية العلوم / جامعة الانبار

أ.د. أحمد محمد تركي / كلية العلوم / جامعة الانبار

الخلاصة

أوضحت نتائج تشخيصالعزلات البكتيرية أن هناك 66 عزلة بكتيرية تعود الى بكتريا *P. aeruginosa* وبواقع 46 عزلة مرضية و 20 عزلة بيئية وتم تأكيد التشخيص بأستخدام التشخيص الجيني وباستعمال *16S rDNA* ولوحظ ظهور حزمة واحدة في حفر الهلام وبالمستوى نفسه بالنسبة لجميع العزلات.أجري فحص الحساسية لجميع العزلات البكتيرية المنتخبة والبالغ عددها 66 عزلة تجاه 19مضادا حيويا بطريقة الانتشار على الاطباق وكانت جميع العزلات مقاومة بنسبة 100% لعدد من المضادات الحيوية المستعملة وهي Amoxicillin\Clavulanic acid،Carbencillin،Cefotaxime ، Ceftriaxone ، Cephalexin و Kanamycin.تباينت العزلات في أنتاج البروتيز القاعدي وذلك على اساس قطر المنطقة المتحلله حول المستعمرة بعد زراعتها على وسط Skim milk agar المستخدم في هذه الدراسة وحسب مصدر العزل إذ تراوح قطر التحلل مابين(0–28)ملم ، في حين استخدمت طريقة أطباقالمعايرةالدقيقة Microtitration plates method (MTP) للكشف عن قدرة العزلات على انتاج صبغة Pyocyanin وتكوين الغشاء الحيوي Biofilmإذ تعطي هذه الطريقة قيمة رقميةللامتصاصيةباستعمال جهاز ELISA readerحيث يعتبر هذا الاختبار تحليل كمي Quantitative assay وأكثر دقة وحساسية من الطرق الاخرى ،فتباينت العزلات في انتاجها لصبغة Pyocyanin وتكوين الغشاء الحيوي بين منتجة بكفائة عالية جدا ، متوسطة الكفائة وذات كفائة قليلة.

المقدمة

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 كالاسواطFlagellam والأهداب من نوع IVPili التي تستعملها في عملية الالتصاق على الخلايا الظهارية والاستيطان ومن ثم تكوين الغشاء الحيوي Biofilmفي موضع الإصابة بعد أن تتجمع بأعداد كبيرة ، والغشاء الحيوي يحميها من دفاعات الجسم و يزيد مقاومتها للمضادات الحيوية (Zubair و آخرون ،2011).كما انلهذه البكتريا قدرة عالية في احداث العديد من الاصابة لدى الإنسانوتعد أكثر المسببات المرضية شيوعا" في مايعرف بعدوى المستشفيات لأنها بكتريا أنتهازية موجودة أصلا" في جسم الإنسان على سطح الجلد يجعلها سهلة الأختراق للجلد وفضلا" عن إنتقالها الى المرضى الراقدين في المستشفيات من خلال الأدوات والأجهزة الملوثة والعاملين في المستشفيات والمرافقين للمرضى ومن خلال كونها ذات أمراضية متعددة ومتغايرة ومعتمدة على عدد واسع من محددات الضراوة التي تعطيها القدرة على استعمار طائفة واسعة كل هذا متأت من قدرتها على التنوع الأيضي مسببة بذلك الأمراض المختلفة في المستشفيات(Nastaran and Hassan , 2014).

ان بكتريا الزوائفالزنجارية تعد من اكثر المسببات للأمراض الحادة والمزمنة التي تصيب العديد من المضائف (Mulcahy*et al.*, 2011).اذ تتواجد بشكل طبيعي في بيئات متعددة كالتربة والمياه وعلى اسطح النباتات وبشكل متطفل على جلد الانسان والحيوان (Bhasin*et al.*,2015)، كما توصف جرثومة *P. aeruginosa*بأنها متعددةعوامل الضراوة (Multifactorial virulence) ومعظم الأصابات بجرثومة*P.aeruginosa*سببها قابلية الجرثومة على الغزو (Invasion)، توليد السموم (Toxinogenic)،قدرتها على الألتصاق الجرثومي والأستيطان(Attachment and colonization) والغزو الموضعي(Local invasion) فضلاً عن قابليتها العالية للأنتشار داخل جسم العائل , .(Westman*et al.* 2010).كذلكتظهر هذه البكتريا كغازيات ثانوية Secondary invaders وتسبب بعض الأمراض المميتة عند الذين يعانون من التليف الحويصليCystic fibrosis والأشخاصالمصابينبالكبت المناعيImmunocompromised، فضلا" عن حالات الجروح والحروق ، وإصابات ذوي نقص المناعة الفايروسيViral immunodeficiency (Bergamini*et al.*, 2012).كمايشير الباحثون إلى إن هذه البكتريا تكون مسؤولة عن 16%من حالات الإصابة بذات الرئة، وتشكل 12% من إصابات المجاري البولية المكتسبة في المستشفيات و 8% من إصابات الجروح و 9-10% من الإصابات إلى مجرى الدم(,Mousa

1997; Solis *etal.*, 2012).ويعود ذلك لما تنتجه تلك البكتريا من عوامل ضراوة عديدة التي تحقق لها الامراضية ، ومنها انتاج الإنزيمات الحاله للبروتين التي تعمل على تحليل الالياف البروتينية لكشف المستقبلات للخلايا البكتيرية (Stones and Krachler,2015) ،ومما زاد من ضراوة تلك البكتريا هو مقاومتها لمجموعة واسعة من المضادات الحيوية Antibiotics ومجموعة متنوعة من المركبات الكيميائية بما في ذلك المنظفاتDetergents والمطهرات (DisinfectantsMitiku*et al.,*2014) ،وهذا ماسمح لهذه البكتريا بالبقاء في المواد المطهرة ،الادوية السائلة ،وكذلك على ارضيات المستشفيات مما ساعد على زيادة نسبة الاصابة بهذه البكتريا في المرضى الراقدين في المستشفى ولا سيما في وحدة العناية المركزة Intensive Care UnitOchoa *et al.*,2013) مما ادى ذلك الى ان تصل نسبة الوفيات المتسببة بهذه البكتريا الى 50 % (David و Gardner ،2011).

اصبح استخدام تقنية PCR في الكشف عن الممرضات البكتيرية من الطرق السريعة والدقيقة ولاسيما عندما تكون تلك الممرضات صعبة التنمية في المختبر وتحتاج الى مدة حضن طويلة لكي تنمو في الوسط الزرعي (Yamamoto,2002) حيث وجد العديد من تلك الجينات التي يمكن ان تستخدم لتشخيص بكتريا *P. aeruginosa*بواسطة تقنية الـ PCR ومنهاrDNA 16S ويتم تصميم البادئ لهذا الجين (Salman *et al.*,2013).

حيث أدى استعمال تسلسلاتrDNA 16S إلى أعادة تصنيف العديد من الأجناس البكتيرية ونقل احياء من جنس إلى أخر وكذلك من نوع إلى أخر واستحداث أجناس وأنواع جديدة (Woo *et al.*,2008)،وباستعمال الجينrDNA 16Sالذي وفر التشخيص الدقيق لبكتريا*P. aeruginosa*وميزها عن باقي أجناس الـ pseudomonas ولذلك يعد التشخيص الجزيئي ادق من الاختبارات التقليدية المستعملة مختبريا (Altaai*et al.*,2014)،إذأن الجينrDNA 16S له تسلسل ثابت لكل نوع ولذلك يعطي تشخيصا ع مستوى النوع ومن هنا جاء دورهالمهم جدا في التشخيص الجزيئيMolecular Identification (Hussien*et al.*,2012)،وعليه فان الفائدة المهمه عند استعمال هذه الطريقة هي التشخيص السريع عند الاصابة ببكتريا*P. aeruginosa* مما يوفر لنا الاستعمال المبكر للمضادات الحيوية المناسبة للقضاء على الاصابة ومنع العدوى (Ugur*et al.*,2012).

المواد وطرق العمل

عزل وجمع العينات

جمعت (207) عينة من مرضى يعانون من مختلف الحالات المرضية شملت أخماجالحروق، الجروح ، التليف الكيسي ، التهاب الاذن الوسطى ومن التهاب العيون،إذ تم الحصول على العينات من مختبرات بعض المستشفيات في بغداد شملت مستشفى الطفل المركزي ومستشفى الكندي التعليمي ومستشفى ابن البلدي للنسائية والاطفال ومستشفى النعمان للمدة من (2015/10/15) ولغاية (2016/1/15).

تشخيص العزلات

تم تشخيص العزلات باستخدام الطرائق الزرعية وباستعمال عدة اوساط من خلال ملاحظة قدرتها على النمو على وسط اكار السيدوموناسPseudomonas agar ، الوسط الخاص ببكتريا Pseudomonas ، وسط اكار السترمايدCetrimide agar والوسط الانتخابي لبكتريا الزوائفالزنجارية وكذلك زرعت على وسط الماكونكيMacConkey agar وكذلك زرعت على اكار الدمBlood base agar لتشخيص صفاتها المزرعية ايضا من حيث شكل ولون المستعمرات (Baron *et al.*,2007)، واستخدام فحوصات البايوكيميائية مثلOxidase و Catalase .

عزل DNA

تم استخلاص وتنقية DNA باستخدام عدة استخلاص DNA الكلي وحسب تعليمات الشركة المصنعة (Promega).

تشخيص البكتريا

تم استعمال جين 16S rDNA للتشخيص النهائي للعزلات البكتيرية قيد الدراسة وبواسطة جهاز تضاعف البلمرة المتسلسل (PCR) واستعمل البادئ الخاص بالجين 16S rDNAوالموضح بالجدول ادناه :

اسم البادئ	تسلسل القواعد 3'→5' Primer sequence (5′–3′)	الناتج قاعدة لكل زوج(bp)
16srRNA–F 16srNA–R	GGGGGATCTTCGGACCTCA	956
	TCCTTAGAGTGCCCACCCG	
	TGGTGGCGATCTTGAACTTCTT	

وبالظروف التفاعلية المستعملة وحسب البرنامج الذي ورد في (2004) Spilker*et al.* على النحو التالي :

برمجـة جهـاز PCR (٢-٦)

الخطوة		العملية
١		دورة واحدة لمدة دقيقتين بدرجة حرارة 95 م° للمسخ الاولي DNA القالب
٢		25 دورة تضمنت :-
	A	20 ثانية عند درجة حرارة 94 م° لمسح دنا القالب
	B	20 ثانية عند درجة حرارة 58 م° لارتباط البوادىء بدنا القالب
	C	40 ثانية عند درجة حرارة 72م° لاستطالة البوادىء المرتبطة
٣		دورة واحدة لمدة [دقيقة واحدة بدرجة 72 م° للاستطالة النهائية لشريط

		DNA المتضاعف.

فصلت نواتج التفاعل باستخدام الاكاروز بتركيز 1% الحاوي على5مايكروليتر من صبغة Eithidium bromide وباستعمال DNA ladder(100bp)وبفرقجهد 75 فولت لمدة ساعة وتم التصوير باستخدام UV light.

اختبار فحص الحساسية للمضادات الحيوية

اعتمدت طريقة Kirby baureالواردة في Atlas واخرون (1995). لأجراء فحص الحساسية للمضادات الحيوية وباستعمال وسط Muller Hinton agar واختبرت مقاومةالعزلات للمضادات الحيوية وهي Amoxicillin\Clavulanic acid، Ampicillin، Carbencillin، Cefotaxime ، Ceftriaxone ، Cephalexinو Kanamycinقرئت النتائج بقياس أقطار تثبيط النمو بالمليمتر وقورنت النتائج مع أقطار التثبيط القياسية طبقا لماُ أشير فيCLSI) (2012,.

التحري عن أنتاج أنزيم البروتيز (الأنزيم المحلل للبروتين) Protease production

زرعوسط Skim milk agarبالعزلات البكتيرية وحضنت مدة 24 ساعة بدرجة 37 م وقيست قطر منطقة التحلل (Benson , 1998).

استخدام الأليـــــزا في قياس تكوين الغشاء الحيويFormationBiofilm وانتاج صبغة البايوسيانين Stain Pyocyanin Production

والتي فيها يتم تنمية العزلاتباطباق المعايرة وبعد فترة حضن 24 ساعة يتم الكشف عن قابلية العزلات على انتاج صبغة البايوسيانينفيما صبغة الجدران بصبغة البنفسج البلوري (Crystal violet) بعد غسل الحفر ومن ثم قصرها لقياس تكوين الغشاء الحيوي والذي يعطي قيمة رقمية للامتصاصية على طول موجي (630) نانوميتر للغشاء الحيوي و (690) نانوميتر لصبغة البايوسيانين باستعمال جهاز ELISA reader( )Bose *etal.* 2009 و Rada et al.,2008.

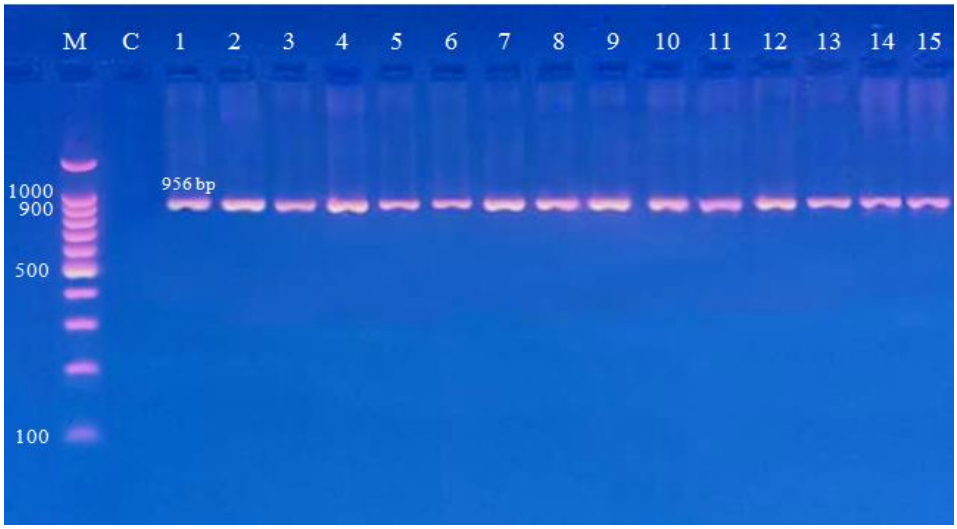
النتائج والمناقشة

بعد التحليلات اللازمة لتشخيص البكتريا تم الحصول على (66) تعود لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من اصل 207 عينة جمعت من حلات مرضية وبيئية مختلفة يوضح جدول () عدد العزلات والنسب المئوية موزع حسب الحالات المرضية والبيئية.

التسلسل	مصدر عزلة العينة	عدد النماذج	العينات الموجبة	النسبة المئوية %
1-	**الحروق**	**63**	**48**	**%76.19**
2-	**الجروح**	**45**	**33**	**%73.33**
3-	**العيون**	**20**	**14**	**%70**
4-	**الأذن**	**30**	**18**	**% 60**
5-	**التليفالكيسي**	**9**	**6**	**% 66.66**
6-	**التربة**	**20**	**18**	**% 90**
7-	**المياه**	**20**	**16**	**% 80**
المجموع		**207**	**153**	**%73.91**

استخلص جميع المشخصة الكشف 16s والذي يعد الجينات عليها في بكتريا *P.* من DNA العزلات وتم عن وجود rDNA من التي يعتمد تشخيص

aeruginosa باستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وبينت نتائج الكشف عن الجين ان جميع عزلات *P.* *aeruginosa* حاملة لهذا الجين والذي يبلغ حجمة 956 زوج قاعدة وكما موضح في الشكل()



شكل () الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل البلمرة المتسلسل لسلسلة الـ DNA باستعمال البادئ 16SrRNA على وسط هلام الأكاروز بتركيز 1.5% M: الدليل الحجمي : 956BP ، C معامل السيطرة السالبة ، 15-1 : أرقام العزلاتلبكتريا *P. aeruginosa*.

أجري فحص الحساسية للمضادات الحيوية المختلفة وأظهرت العزلات تباينا في مقاومتها للمضادات الحيوية حيث أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها ان هناك تباينا واضحا في مقاومة عزلات البكتريا قيد الدراسة تجاه هذه المضادات الحيوية اذ ان جميع العزلات كانت مقاومة بنسبة 100% لعدد من المضادات الحيوية المستعملة وهي Amoxicillin\Clavulanic acid،Carbencillin ، Cefotaxime ، Ceftriaxone ، Cephalexin و Kanamycin ، في حين كانت نسبة المقاومة اتجاه المضادات جدول ()

أسم المضاد	الرمز	عزلات بكتريا *P. aeruginosa*					
		المقاومة(R)		**المتوسطه (I)**		**الحساسة (S)**	
		العدد	**النسبة %**	**العدد**	**النسبة %**	**العدد**	**النسبة%**

–	–	–	–	100	66	AMC	Amoxicillin\Clavulanic acid
–	–	–	–	100	66	PY	Carbencillin
–	–	–	–	100	66	CTX	Cefotaxime
–	–	–	–	100	66	CRO	Ceftriaxone
–	–	–	–	100	66	CL	Cephalexin
–	–	–	–	100	66	K	Kanamycin

بالاعتماد على (CLSI2012). (Sensitive:S , Intermediate:I , Resistant:R)

تم التحري عن بعض عوامل الضراوة التي تمتلكها البكتريا،ومن خلال النتائج التي تم الحصول عليها فان عدد العزلات التي كانت منتجة لأنزيم Protease هي 63 عزلة وبنسبة 95.45% فيما كانت عدد العزلات غير المنتجة ٣ عزلات وبنسبة 4.5% والتي كانت جميعها من التربة،كما بلغت نسبة انتاج صبغة Pyocyanin لدرستنا الحالية 95.45% ،وأظهرت نتائج دراستنا الحالية ان جميع العزلات كانت منتجة للغشاء الحيوي وبنسبة100% .

أظهرت نتائج العزل ان اكثر العزلات المرضية التي تم الحصول عليها كانت من الحروق والجروح وبنسبة 76.19% و 73.33%على التوالي وجاءت نتائج هذه الدراسة متوافقة نوعا ما مع الخالصي(2014)إذ وجد أن بكتريا *P.aeruginosa* كانت هي الأكثر عزلا في عينات أخماج الحروق والجروح المأخوذة من مستشفيات بغداد وكانت بنسبة 76%، كذلك الحال مع دراسة أجريت في إيران لـRastegar و آخرون (2005) إذ كانت نسبة إصابة أخماج الجروح والحروق ببكتريا *P.aeruginosa* هي الأكثر شيوعا وبنسبة 73.1 %، كما اشارت النعيمي (2015) في نتائج دراستها أن أعلى نسبة لبكتريا *P. aeruginosa*كانت 78.57% من التهابات الحروق والتي تتوافق مع نتائج دراستنا الحاليه.

بينت العديد من الدراسات أن بكتريا *P. aeruginosa* لها القابلية على مقاومة العديد من المضادات الحيوية المختلفة لاسيما مضادات البيتالاكتام(Boussoualim*et al.*,2014) ،اذ كانت نسبة المقاومة لمضاد Amoxicillin\Clavulanic acid%100 وهذه النتيجة تتفق مع دراسات عالمية ومحلية كالدراسات التي قامت بها (AL-Shwaikh2006) التي اجرتها على 50 عزلة محلية لبكتريا *P. aeruginosa* معزولة من العينات السريرية ، كما تتفق نتائج الدراسهالحاليه مع العبيدي (2015) الذي وجد أن نسبة المقاومة للمضاد Carbencillin من قبل بكتريا الزوائفالزنجارية كانت 100 % ،ايضا اتفقت نتائج دراستنا مع النتائج التي حصلت عليها (2009) AL-Khazali والتي وجدت أن نسبة المقاومة لمضاد Cephalexin كانت 100%، كما توافقت نتائج دراستنا مع ماتوصل اليهAL-Kaisse(*et al.*2015) التي وجدت ان مقاومة عزلاتالزوائفالزنجارية لكل من المضادينCeftriaxone و Cefotaxime كانت 100% و 88% على التوالي ، كما وجد (2015) AL-Fatlawi ان نسبة مقاومة الزوائفالزنجارية لمضاد Cefotaxime كانت بواقع 100% وهذا متوافق مع نتائج الدراسة الحالية لهذا المضاد،كما اتفقت دراستنا مع ما وجده (EL-Bialy2008) أن مقاومة بكتريا *P. aeruginosa* لمضاد Kanamycin هي 100% .

وعند التحري عن عوامل الضراوة التي تمتلكها البكتريا فان عدد العزلات التي كانت منتجة لأنزيم Protease هي 63 عزلة وبنسبة 95.45% فيما كانت عدد العزلات غير المنتجة 3عزلات وبنسبة 4.5% والتي كانت جميعها من التربة اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع النتائج التي حصل عليها المشهداني (2016) الذي وجد أن 94% من عزلات بكتريا P. aeruginosa كانت لها القابلية على أنتاج أنزيم Protease ،في حينبلغت نسبة انتاج صبغة Pyocyanin لدرستنا الحالية 95.45%تتفق مع ما توصلت اليه الخزرجي (2014) أذ لوحظ ان 95% من عزلاتها كانت منتجة لصبغة Pyocyaninيأتي التفاوت في انتاج تلك الصبغة كونها تعمل كمضادات حيوية اذ تتداخل سلبيا مع عدد من وظائف خلايا الإنسان، ومن أهمها خلايا الجهاز التنفسي ونمو خلايا الجلد وتوازن الكالسيوم وتحرير الانترلوكين. كما ان هذه الصبغة تعمل على تثبيط الكلوبيولينات المناعية (Immunoglobulines) المنتجة من الخلايا اللمفاوية البائية وهذا مايشير الى إن هنالك علاقة وثيقة بين إنتاج الصبغة وامراضية البكتريا(Ran *et al.*, 2003) ،كما أظهرت نتائج دراستنا الحالية ان جميع العزلات كانت منتجة للغشاء الحيويBiofilm وبنسبة100%بدرجات انتاجيةمختلفة بالمقارنة مع السيطرة السالبة بين انتاجية عالية ومتوسطة وضعيفة كما ذكر آنفا اتفقت نتائج دراستنا الحالية مع نتائج الدراسة التي أجرتهاMoteeb (2008)،في مدينة الرمادي على بكتريا*P. aeruginosa* وبكتريا.*Klebsiella spp*وكانت إنتاجية بكتريا *P. aeruginosa*للغشاء الحيوي بطريقة (MTP) إذ كانت العزلات جميعها وبنسبة100%ذات

إنتاجية عالية للغشاء الحيوي، كما أن ارتفاع النسبة المئوية لقابلية عزلات بكتريا *P. aeruginosa*على أنتاج الغشاء الحيوي يفسر ارتفاع نسب المقاومة من قبل هذه العزلات اتجاه جميع المضادات الحياتيةإذ يلعب الغشاء الحيوي دورا كبير في أمراضية البكتريا و مقاومتها للعديد من المضادات الحياتية ،لأنها تكون مغمورة في بروتينات المضيف والطبقة المخاطية الميكروبية ، التي توفر بدورها مكان مناسب لنمو البكتريا والكائنات الأخرى مما يزيد من مقاومتها للعلاج وهذا يؤدي إلى خلق مشكلة كبيرة (Hassan وآخرون 2011 و Saxenaوآخرون ،2014).

ان التشخيص باستعمال الجين 16S rDNA يعد من الجينات التشخيصية الدقيقة للنوع *P. aeruginosa*وللانواع الاخرى وذلك لان له تسلسلا ثابتا لكل نوع من الأنواع البكتيرية وله دور مهم جدا في كل من التشخيص الجزيئي Molecular identification والتصنيف Classification كذلك قام Amutha and Kokila (2012) بتشخيص بكتريا *P. aeruginosa* المعزولة من التربة بوساطة الجين 16S rDNA اذ وجد ان هذه التقنية مناسبة لعملية تشخيص الانواع البكتيرية وغالبا مايستعملتسليلات منطقة الجين 16S rDNA في مجال دراسة العلاقات التطورية للسلالات المختلفة لهذه البكتريا، ولكون مناطق هذا الجين عالية الثبات وغير قابل للتغير مع مرور الزمن وبالتالي يعد معيارا مناسبا في مجال التصنيفClassification، بالاظافة الى ثباته العالي فان جين 16S rDNA يحتوي على مناطق عالية التغاير بين الانواع البكتيرية وبذلك يوفر تسلسلا خاصا بكل نوع من الانواع التي يستفاد منها في تشخيص الانواع البكتيرية (Brooks *et al*,2010).

References

- ألخالصي ، علي حسينعلاألدين .(٢٠١٤) . دراسة تأثير التثبيطي لعسل النحل المحلي ضد الإصابة البكتيرية واستعمالها في معالجة الجروح والحروق .كلية التربية الأساسية ، الجامعة المستنصرية.
- الخزرجي، مهاهانيتوفيق. (2014) .استخلاص وتوصيف المنشطالسطحي الحيويRhamnolipid من بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa*المعزولة من بعضالحالات السريريةوالبيئية ،رسالة ماجستير، كلية للعلوم للبنات ،جامعة بغداد.
- المشهداني،أحمد محمد يوسف ياسين. (2016).التباين المظهري والجزيئي لبعض الجينات الخاصة بالضراوة والصفات التشخيصية للعزلات المرضية للزوائفالزنجارية ، رسالة ماجستير ،كلية العلوم ،جامعة الانبار.

❖ النعيمي ،عُلاعبدالكريمكاظم. (2015). دراسة تأثير البروبايوتك في تكوين الغشاء الحيوي وانتاج أنزيم البروتيز لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من أخماج الحروق والجروح ، رسالة ماجستير،كلية التربية الأساسية ،جامعة المستنصرية.

❖ **AL-Khazali**, K.A.O. (2009) . Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* isolated from burns and wounds infections to antibiotics and some disinfectants . M.Sc. thesis . Collage of Science . University AL-Mustansiriya .

❖ **Al-Shwaikh**, R. M. (2006) . Production and Characterization of Protease from Pseudomonas aeruginosa Isolated from Some Clinical Cases and its Relation with some Antibiotic Agents . Ph.D.Thesis . College of Science . AL-Mustansiryia University.

❖ **Altaai**, M.E. ; Aziz, I.H. and Marhoon, A.A. (2014) . Identification *Pseudomonas aeruginosa* by 16SrRNA gene for differentiation from others *Pseudomonas* species that isolated from patients and environment . *J. Bagh. Sci;*11(2): 1028-1034 .

❖ **Amutha**, K. and Kokila, V. (2012) . PCR Amplification sequencing of 16S rRNA genes with universal primers and phylogenetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* . *Inte. J. Sci. Res.*; 3(8): 257-266 .

❖ Asmaa A. AL-Kaisse, Amina N. AL-Thwani, Rabab Q. AL-Segar (2015). Incidence and Antibiotics Sensitivity of Multidrug-Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Burn's Patients and Environmental Samples fromThree Hospitals in BaghdadJournal of Biotechnology Research Center, 9 (2): 67-73.

❖ **Atlas** ,R.M. (1995). Principles of Microbiology 1st Mosby Year Book, Inc., st.Louis, Missouri.

- **Baron**, E. J. ; Finegold, S. M. and Peterson, I. L. R. (2007) .Bailey and Scotts Diagnostic Microbiology. 9th ed. *Mosby Company*. Missouri.
- **Benson**, H. J. (1998). Microbiological applications laboratory manual in general microbiology.7th ed. The McGraw-Hill Co. p:431.
- **Bergamini**, G.D., Disilvestre, D., Mauri, D., Mauri, P., Cigana, C., Bragonz, A., Depalma, A., Benazzi, L., Doring, G., Assael, B.M., Metott, P.andSorio, C. (2012). Mud P.T analysis of released proteins in *Pseudomonas aeruginosa* Laboratory and Clinical strains in relation to pro.Infaimmatoryeffects.Integr.Biol., 4 (3): 270-9.
- **Bhasin**, S. ; Shukla, A.S. and Shrivastava, S. (2015) . Observation on *Pseudomonas aeruginosa* in Kshipra river with relation to anthropogenic activities . *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 4(4): 672-684 .
- **Bose**, S. ; Khodke, M. ; Basak, S. ; Mallick, S.K.(2009).Detection of biofilmproducing*Staphylococci* : need of the hour. *J. Clin. Diag. Res.*, 3:1915-1920.
- **Boussoualim**, N. ; Trabsa, H. ; Krache, I. ; Arrar, L. ; Khennouf, S. and Baghiani, A. (2014) . Anti-bacterial and β-lactamase inhibitory effects of *Anchusaazurea*and *Globulariaalypum*extracts . *Res. J. Phar. Bio. Che. Sci.* 5(1): 742-749 .
- **Brooks**, G.F.; Carroll,K.C; Butel,J.S.; Mores,S.A. and Mietzner,T.A . (2010) .Jawetz,MelnichandAdelbergs Medical Microbiology .25th ed.thr*McGraw-Hill companies*,United states of American.
- **CLSI**. (2012) . Performance standards for antimicrobial susceptibility testing twenty-second informational supplement . *Clinical Laboratory Standards Institute;* 31(1): 124-128 .

- **David**, G. and Gardner, D. (2011). Greenspan's basic & clinical endocrinology (9th ed.). New York: McGraw-Hill Medical.Chapter 17.
- **El-Bialy**, A.A. ; El-Shennawy, G.A. ; Mosaad, A.A. and Bendary, L.A. (2008) . Phenotyping and genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* urine isolates in zagazig university hospitals . *Egyptian J. Medical Microbiology;*17(4): 615-626 .
- **Hassan**, A.; Usman, J.; Kaleem, F.; Omair, M.; Khalid, A.; and Iqbal, M.(2011). Evalution of different methods of Biofilm formation inthe clinical isolates. Braz. J. Infect Dis.15(40):305-311.
- **Hussien**, I.A. ; Habeb, K.A. and Jassim, K.A. (2012) . Identification of *Pseudomonas aeruginosa* from burn wounds isolates by PCR using exotoxin A-specific primers . *Iraqi J. Biotech*.; 11(2): 282-291 .
- **Mitiku**, M. ; Ali, S. and Kibru, G. (2014) . Antimicrobial drug resistance and disinfectants susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical and enviromental samples in jimma university specialized hospital , southwest ethiopia . *Ame. J. Biom. Life Sci*.; 2(2): 40-45 .
- **Moteeb**, H. (2008). Quantitative and Qualitative assay of bacterial Biofilm produced by Pseudomonas aeruginosa and Klebsiella spp. J. of Al-Anbar University for pure sci.; 2(3): 2030-2033.
- **Mousa**, H. A. (1997). Aerobic anaerobic and fungal burn waund infections. J. Hosp. Infect., 37: 317-323.
- **Mulcahy**, H., Sibley, C. D., Surette, M. G. and Lewenza, S. (2011). *Drosophila melanogaster* as an Animal Mode for the Study of *Pseudomonas aeruginosa* Bioflim Infection *In vivo*PLoSPathog., 7 (10).
- **Nastaran**Fazeli and Hassan (2014). Virulence gene profiles of multidrug –resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian hospital infections.

- **Ochoa**, S.A. ; Lopez-Montiel, F. ; Escalona, G. ; Cruz-Cordova, A. ; Davila, L.B. ; Lopez-Martinez, B. ; Jimenez-Tapia, Y. ; Giono, S. ; Eslava, C. ; Hernandez-Castro, R. andXicohtencati-Cortes, J. (2013).Pathgenic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* strians resistance to carbapenems associated with biofilm formation . *J. Bol. Med. Hosp. Infant*. 70(2): 133-144 .
- **Rada** B, Lekstrom K, Damian S, Dupuy C, Leto TL (2008). *The Pseudomonas toxin pyocyanin inhibits the dual oxidase-based antimicrobial system as it imposes oxidative stress on airway epithelial cells.* The journal of immunology.; 181: 4883-4893.
- **Ran** H, Hassett DJ, Lau GW (2003). Human targets of Pseudomonas aeruginosa pyocyanin. Proc Natl Acad Sci;100(24):14315-20.
- **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; 453(2): 1-9.
- **Salman**, M. ; Ali, A. and Haque, A. (2013) . A novel multiplex PCR for detection of *Pseudomonas aeruginosa* A major cause of wound infections . *Pak. J. Med. Sci.;*29(4): 957-966 .
- **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.8(5): 9-11.
- **Solis**, Y., Alvarez, A. M., Fuentes, D., Dea-Barra, D., Avites, C. L., Becker, A., Salgado, C., Silva, P., Topelberg, S., Tordecilla, J., Varas, M., Villarroel, M., Viviani, T., Zubieta, M., Aedo, S. and Santoloya, M. E. (2012). Blood stream infections in children with cancer and highrisk fever and neutropenia episodes in six hospitals of Santiago, Rev. chilena. Infec.; 29 (2): 156-62.

- **Stones**, D.H. and Krachler, A. (2015) . Fatal attraction: how bacterialadhesins affect host signaling and what we can learn from them . *Int. J.Mol. Sci.* 16: 2626-2640 .
- **Ugur**, A. ; Ceylan, O. and Aslim, B. (2012) . Characterization of *Pseudomonas* spp. from seawater of the southwest coast of turkey . *J.Biol. Environ. Sci.*; 6(16): 15-23 .
- **Westman** , E.L. ; Matewish , J.M. and Lam , J. S. (2010) . Pathogenesis of bacterial infections in animals . Edited by Gyles , C.L. ; Prescott , J. F. ; Songer , J.G. and Thoen , C.O. 4th ed. , Jhonwiley and Sons, Inc . , publication .
- **Woo**, P.C.Y. ; Lau, S.K.P. ; Teng, J.L.L. ; Tse, H. and Yuen, K.Y. (2008). Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories . *J. Compilation;* 14: 908-934 .
- **Yamamoto**, Y. (2002) . PCR in diagnosis of infection : detection of bacteria in cerebrospinal fluids . *Clini. Lab. Imm.*; 9(3): 508-514.
- **Zubair**, M.; Malik, A.; Ahmad, J.; Rizvi, M.; Farooqui, K.; Rizvi, M. (2011). A study of biofilm production by gram-negative organisms isolated from diabetic foot ulcer patients. J. Bio. Med.; 3(2): 147-157.