المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية لبكتريا Pseudomonas aeruginosa المقاومة للكولستين والتحري عن الجين المشفر لمضخة الدفقMexXY

محمد فرج المرجاني و نبراس رضا محمد
قسم علوم الحياة/ كلية العلوم / الجامعة المستنصرية

Multi drug resistance in colistin resistant pseudomonas aeruginosa isolates and detection of MexXY efflux pump gene

Mohammed F. AL- Marjani and Nebras R. Mohammed
Department of Biology – College of Science - AL- Mustansiriya University, Baghdad- Iraq

Abstract

One Hundred and Twenty isolates of Pseudomonas aeruginosa were collected from different samples during the period August /2014 to December /2010 .Sensitivity of isolates was tested against colistin , results revealed that 27 isolates(22.5%) were resistance to colistin. The colistin resistant isolates (and 21 sensitive isolates) were tested against 12 different antibiotics ,the results showed that all isolates were resistance to amoxicillin and carpencillin .Norfloxacin , Levofloxacin and Ciprofloxacin were found to be the most effective agents against the isolates. On the other hand the results showed that all isolates were able to produce hemolysin and biofilm formation.
Polymerase Chain Reaction (PCR) technique was performed using specific primer targeting the specific sequences of the mexY gene, The results showed that mexY gene found in 74% of colistin resistant isolates.

Keywords: Pseudomonas aeruginosa ,colistin resistance,efflux pumps ,MexXY.

المستخلص

تم الحصول على 120 عزلة تعود لبكتريا P.aeruginosa من اصابات مختلفة في بعض مستشفيات مدينة بغداد للمدة من شهر أب /2014 ولغاية شهر كانون الاول 2014 ، تم أختبار حساسية العزلات تجاه مضاد الكولستين، وأظهرت النتائج وجود (27) عزلة مقاومة لهذا المضاد (22.5%) ، من جانب اخر اختبرت العزلات المقاومة للكولستين تجاه أثناعشرة مضادا من مجاميع مختلفة بأستعمال طريقة الأقراص. أظهرت النتائج أن جميع العزلات المختبرة كانت مقاومة لمضادات الاموكسسلين والكاربنسلين، واظهرت بعض العزلات مقاومة عالية لمضادات Gentamycin(70.8%) و Nalidixic acid(79.2%) ، بينما كانت المقاومة الأقل هي لمضادات Norfloxacin(13.3%) و Levofloxacin(12.5%) و Ciprofloxacin (9.0%).
أختبرت قابلية العزلات المقاومة للكولستين على انتاج الهيمولايسين وتكوين الغشاء الحيوي وقد اظهرت النتائج ان جميع العزلات منتجة للهيمولايسين ، وكانت جميع العزلات مكونه للغشاء الحيوي (Biofilm). أخضعت العزلات المقاومة للكولستين للكشف الجيني عن مضخة الدفق MexXY باستعمال تقنية PCR، وبعد ترحيل ناتج التضاعف في هلام الأكاروز لوحظ ان 74% من العزلات تمتلك الجينmexY المشفر لمضخة الدفق اعلاه .

الكلمات المفتاحيه : بكتريا Pseudomonas aeruginosa ، مقاومة الكولستين ، مضخة الدفقMexXY

المقدمة

تسبب بكتريا Pseudomonas aeruginosa أمراضا عديدة في جسم الأنسان منها أخماج الجروح والحروق، وأخماج العين و الجلد ، والمجاري البولية ، والأذن الوسطى ، وتجرثم الدم (Bacteremia) ، خاصة عند الأشخاص الذين يعانون من أمراض

نقص المناعة والأشخاص المصابين بالأيدز فهي أحد أهم الأنواع البكتيرية المسببة لما يعرف بالأصابات المكتسبة في المستشفيات (1) ، ويعود سبب صعوبة علاج الاصابات بهذه البكتريا الى مقاومتها للعديد من المضادات المايكروبية ومنها مضادات البيتالاكتام (B-lactams) والماكروليد (Macrolids) , فضلا عن مقاومتها العالية لمضادات فلوروكوينولونات (Flouroquinolones), مما يجعلها واحدة من أخطر الممرضات وأكثرها أصابة للأنسان (2,3) . أن قابلية بكتريا P.aeruginosa للألتصاق وتكوين الغشاء الحيوي متعدد الطبقات على أنسجة المضيف والسطوح الأخرى تعد واحدة من أهم عوامل الضراوة المهمة والتي تزيد من خطورة هذه البكتريا . يعد مضاد الكولستين احد المضادات المهمة كعلاج ضد أغلب اصابات العصوية الهوائية السالبة لصبغة كرام وهو قاتل بكتيري (bacteriocidal) ، يعمل على غشاء الخلية البكتيرية من خلال الأرتباط الأولي بالغشاء الخارجي للبكتريا اذ يعمل على ازاحة المغنيسيوم (2+ Mg) والكالسيوم (2+Ca) مما يؤثر على أستقرار جزيئة عديد السكريات الشحمي سالب الشحنه ، وبالتالي يؤدي الى عرقلة التوازن الأزموزي وتسرب مكونات الخلية (4) , وهو يسبب زيادة نفاذية غشاء الخلية ، وتكسير مكونات الخلية ، وبالتالي موت الخلية (5) ، ويعود سبب مقاومة هذه البكتريا لمضاد الكولستين الى الية الضخ البكتيري المعتمد على الطاقة وهو السبب الرئيس لاكتساب الممرضات الأنتهازية للمقاومة المتعددة للمضادات الحيوية (6). يشفر جينوم هذه البكتريا لأنواع من مضخات الدفق المشفر لها كروموسوميا والتي تعود للعائلة (Resistance Nodulation cell-Division RND) , فضلا عن مضخات الدفق المشفر لها بلازميديا التي تضخ المضادات , وهذا مايسمى بمضخات الدفق المتعددة MDR-Efflux pumps مثل مضخة الدفق MexAB-OprMومضخات دفق أخرى مهمة سريريا مثل MexXY و MexCD-OprN (7).

أن حدوث الطفرات الوراثية في الجينات يؤدي الى حصول تطور سريع في مقاومة بكتريا P.aeruginosa للمضادات الحيوية وذلك خلال مدة قصيرة من أستعمال هذه المضادات في العلاج, ويعد هذا النوع من المقاومة خطير جدا وذلك بسبب تطور المقاومة أثناء العلاج وهو ما قد يسبب فشلا في علاج أصابات هذه البكتريا الأمر الذي يتطلب البحث عن علاجات جديدة أو أستعمال أكثر من علاج في ان واحد للحد في مقاومة هذه البكتريا (8). تعد الدراسات المحلية عن مقاومة هذه البكتريا للكولستين قليلة جدا لذا اتأت أهداف هذه الدراسة التحري عن طبيعة مقاومة الكولستين(colistin) ومدى انتشارها في مستشفياتنا المحلية .

المواد وطرائق العمل

العزلات البكتيرية

تم الحصول على120 عزلة تعود لبكتريا **P.aeruginosa** من اصابات مختلفة في بعض مستشفيات مدينة بغداد للمدة من شهر أب /2014 ولغاية شهر كانون الاول 2014 ، تم التاكد من تشخيص العزلات أعتمادا على الفحوصات المظهرية والكيموحيوية التي وردت فيForbes وجماعته (9).

اختبار حساسية العزلات لمضاد الكولستين

أختبرت حساسية العزلات للكولستين بطريقة الاقراص باستخدام وسط آكار مولر هنتون وتم تحديد حساسية العزلات ومقاومتها للمضادات المايكروبية بأعتماد قياس قطر منطقة التثبيط بالمليمتر حول أقراص المضاد وقورنت النتائج بما ورد في (10).

اختبار الحساسية للمضادات الحيوية الاخرى

أختبرت حساسية العزلات المقاومة للكولستين وبعض العزلات الحساسه له للمضادات الحيوية الاخرى بطريقة الاقراص باستخدام وسط آكار مولر هنتون وتم تحديد حساسية العزلات ومقاومتها للمضادات المايكروبية بأعتماد قياس قطر منطقة التثبيط بالمليمتر حول أقراص المضادات المستعملة وقورنت النتائج بما ورد في CLSI(10) , وشملت المضادات Amoxcillin , Carpencillin , Aztreonam التابعة لمجموعة البيتالاكتام و المضادات , Lomefloxacin , Norfloxacin Ciprofloxacin , Levofloxacin , Ofloxacin , Nalidixic acid التابعة لمجموعة الكوينولونات و المضادات Gentamycin , Tobramycin التابعة لمجموعة الأمينوكلايكوسيدية ومضاد Polymyxin B التابعة لمجموعة البوليميكسين.

إختبار التحري عن تكوين الغشاء الحيوي (Biofilm)

استعملت طريقة الزرع على وسط احمر الكونغو للكشف عن قابلية العزلات على تكوين الغشاء الحيوي وحسب ما ورد في Mathur وجماعته (11). تعد النتيجة موجبة حينما تظهر المستعمرات سوداء اللون مع كثافة بلورية جافة، أما النتيجة السالبة فتبقى المستعمرات وردية اللون .

أختبار قابلية العزلات على أنتاج البروتييز

اختبرت قابلية العزلات على انتاج انزيم البروتييز باتباع طريقة Benson (12) باستعمال وسط حليب الفرز .

الكشف عن قابلية العزلات على أنتاج الهيمولايسين

أختبرت قابلية العزلات البكتيرية على أنتاج الانزيم الحال للدم بزرع وسط اكارالدم الاساس المحضر بلقاح عزلات بكتريا Ps.aeruginosa بطريقة التخطيط والطعن في الوسط الزرعي، حضنت الاطباق في درجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة، لوحظ بعدها تكون مناطق تحلل شفافة حول المستعمرات البكتيرية دلالـة علـى ايجابية الفحص (13).

عزل DNA البكتيري

عزل الدنا البلازميدي والكروموسومي من عزلات البكتريا المقاومة لمضاد الفانكومايسين باعتماد عدة أستخلاص الدنا المجهزة من شركة promega (USA) من العزلات البكتيرية المشخصة .

الكشف عن جين مضخة الدفق mexy باستعمال تقنية PCR

أختيرت البوادئ النوعية المُستهدفة لجيناتmexy في بكتـــريا Ps aeruginosa وفقاً لما ذكر في Hocquet (14) حسب تسلسل البادئ mexy1'5-TGG TCA ACG TCA GCG CCAGCT AT -3'
و 5'-TCGACGATCTTCAGGCGTTCTG-3'mexy2

وبعد انتهاء فترة التضاعف حسب البرنامج المذكور في (14) تم الكشف عن نواتج التضاعف بترحيل العينات على هلام الأكاروز المحضر بتركيز (1)% , حملت العينات بأستعمال داريء التحميل الجاهز فضلا عن ترحيل DNA Ladder . ثم رحلت النواتج و DNA Ladder كهربائيا لمدة ساعه واحدة ، فحص الهلام بعد أنتهاء الترحيل من خلال تعريضه لمصدر الأشعة فوق البنفسجية وتم تقدير الأحجام الجزيئية للقطع المتضاعفة مقارنة بموقع الحزم في DNA Ladder المستعمل والمرحل مع نواتج التضاعف.

النتائج والمناقشة

تم الحصول على120 عزلة تعود لبكتريا **P.aeruginosa** من اصابات مختلفة في بعض مستشفيات مدينة بغداد للمدة من شهر أب /2014 ولغاية شهر كانون الاول 2014 (جدول 1) .

جدول (1) : أعداد عزلات بكتريا P.aeruginosa المعزولة من عينات سريرية مختلفة موزعة حسب مصدرها .

نوع العينات	عدد عزلات بكتريا P. aeruginosa
الأدرار	33
أخماج الحروق	25
القشع	25
أخماج الجروح	17
الدم	12
الأذن	5
أدوات القثطرة البولية	3
المجموع الكلي	120

أختبرت حساسية عزلات الدراسة البالغة 120 عزلة تجاه مضاد colistin وأظهرت النتائج وجود 27 عزلة مقاومة للكولستين 22.5% بأستعمال طريقة الأقراص . لاتتفق نتائج الدراسة الحالية مع الباحث Mohanty وجماعته (15) أذ وجد أن عزلات P.aeruginosa المقاومة للكولستين هي فقط 6% .

من جانب اخر اختبرت العزلات المقاومة للكولستين (اضافة الى 21 عزلة حساسة له) تجاه أثناعشرة مضادا من مجاميع مختلفة بأستعمال طريقة الأقراص.أظهرت النتائج أن جميع العزلات في هذه الدراسة كانت مقاومة لمضادات الاموكسسلين والكاربنسلين، بينما اظهرت بعض العزلات مقاومة عالية لمضادات Nalidixic acid(79.2%) , Gentamycin(70.8%) ,Lomefloxacin(58.3%) , Tobramycin(56.3%) وكانت المقاومة الأقل هي لمضادات Ofloxacin(27.0%) ,

Levofloxacin(12.5%) , Norfloxacin(13.3%) , Polymyxin B (18.7%), , Aztreonam(18.8%) , Ciprofloxacin (9.0%) (جدول 2).

جدول (2): مقاومة عزلات بكتريا P.aeruginosa للمضادات المايكروبية الاخرى

المضاد المايكروبي	الرمز	نسبة المقاومة%
Amoxcillin	AX	100
Carbencillin	PY	100
Aztreonam	ATM	18.8
Gentamycin	CN	70.8
Tobramycin	TOB	56.3
Polymyxin B	PB	18.7
Norfloxacin	NOR	13.3
Lomefloxacin	LOM	58.3
Ciprofloxacin	CIP	9.0
Levofloxacin	LEV	12.5
Ofloxacin	OFX	27.0
Nalidixic acid	NA	79.2

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن هناك مقاومة عالية أبدتها عزلات بكتريا P.aeruginosa لمضادات البيتالاكتام والمتمثلة بالمضاد الاموكسسلين وقد كانت نتائج الدراسة الحالية متفقة مع النتائج التي حصل عليها محسن (16) أذ كانت نسبة المقاومة لمضادات الأموكسسلين 100% .

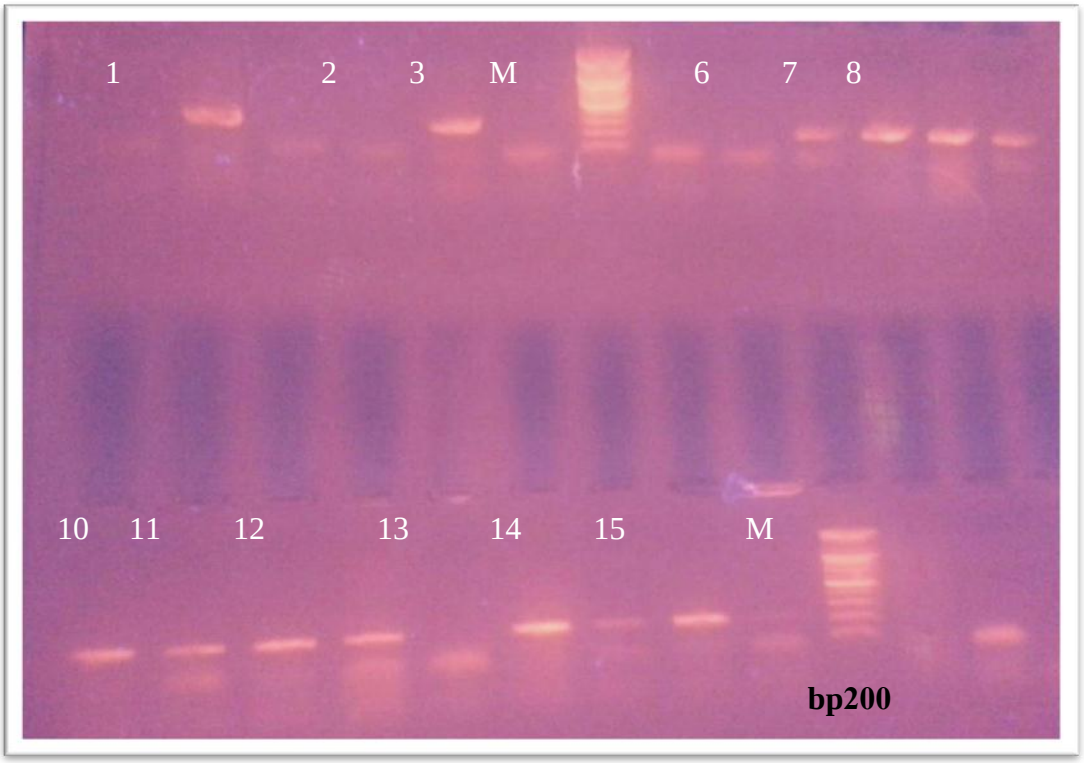
أما مجموعة الأمينوكلايكوسيدية التي شملت كل من مضاد Gentamycin و Tobramycin فقد بلغت نسبة المقاومة لها في هذه الدراسة 70.8% و 56.3% على التوالي وجاءت نتائج الدراسة مقاربة لما توصلت اليه العبيدي (17)التي أشارت الى أن نسبة مقاومة العزلات لمضاد Tobramycin هي 46% وقد بينت Al Gherawi (18) أن نسبة مقاومة بكتريا P.aeruginosa لمضاد Gentamycin هي 66% وهي مقاربة للنتيجة التي تم التوصل اليها في هذه الدراسة . تعود مقاومة البكتريا لمضادات الأمينوكلايكوسيدية الى أفراز البكتريا لأنزيمات Aminoglycoside modifying enzyme (AMEs) (6) . من جانب اخر بالنسبة لمضادات الكوينولونات نجد أن المضادات الحيوية Ofloxacin و Norfloxacin (من مجموعة فلوروكوينولونات) قد أظهرت فعالية جيدة ضد عزلات بكتريا P.aeruginosaأذ كانت نسبة العزلات الحساسة للمضاد Ofloxacin 43.8% وهو من بين أنواع المضادات الحيوية الأكثر تأثيرا على العزلات قيد الدراسة أذ أظهرت النتائج أن جميع العزلات كانت حساسة له عدا 13عزلة فقط كانت مقاومة . أما بالنسبة لمضاد نورفلوكساسين فكانت نسبة المقاومة منخفضة فكانت النسبة المقاومة 13.3 % . أما مضاد Ciprofloxacin فقد أظهرت الدراسة الحالية أنخفاضا نسبيا في مستوى المقاومة له والتي كانت 9% وكانت هذه النتائج مقاربة لما حصل عليه الباحث النقيب (19)الذي وجد أن نسبة المقاومة لهذا المضاد 19%.

أما أعلى نسبة مقاومة لوحظت في مضادات الكوينولونات هي لمضاد Nalidixic acid أذ و بنسبة 79.2% وقد يرجع سبب ذلك لكونه أول مضاد أكتشف من مجموعة الكوينولونات حيث أن كثرة الأستخدام لهذا المضاد جعل من البكتريا تتمكن من مقاومة هذا المضاد أما من خلال المقاومة المكتسبة أو الذاتية لها وتتفق النتيجة مع دراسة الكعبي(20) أذ حصلت الباحثة على مقاومة تامة لمضاد Nalidixic acid في دراستها على بعض أنواع البكتريا السالبة لصبغة كرام . أختبرت قابلية العزلات المقاومة للكولستين لأنتاجها أنزيم الهيمولايسين وقد اظهرت النتائج ان جميع العزلات منتجة لهذا الأنزيم بنسبة 100% ، يعد أنتاج الهيمولايسين من عوامل الضراوة المهمة لهذه البكتريا أذ يعمل على تحليل كريات الدم الحمراء Erythrocyte مسببا فقر الدم anemia وضعف دفاعات المضيف وبذلك يوفر كميات كبيرة من الحديد الذي تستفيد منه البكتريا في الفعاليات الأيضية وأن أنتاج الهيمولايسين يسبب تحطيم الأنسجة ويسهل أنتشار البكتريا وتحرير مغذيات المضيف (21) .

وأختبرت هذه العزلات على أنتاجها للغشاء الحيوي وكانت جميع العزلات المقاومة للكولستين منتجة للغشاء الحيوي ، تتفق هذه النتائج مع نتائج Nagaveni وجماعته (22) الذي بين أن 72.7% من العزلات أعطت مستعمرات سوداء اللون على وسط أحمر كونغو بينما 27.2% من العزلات أعطت مستعمرات وردية اللون دليل على عدم تكوينها للغشاء الحيوي وقد أشار الى أن تكوين الغشاء الحيوي من قبل البكتريا على أنسجة المضيف والسطوح الأخرى يعد أحد أهم عوامل الضراوة المهمة والتي تزيد من خطورتها اذ يعمل على حماية الخلايا البكتريه من تأثير المضاد الحيوي .أختبرت العزلات المقاومة للكولستين لأنتاجها أنزيم

البروتييز واظهرت النتائج ان جميع العزلات المختبرة كانت منتجة لأنزيم البروتييز ، تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ماتوصل اليه AL-Tikrity (23) الذي أشار الى أن 86.1% من سلالات P.aeruginosa لها القابلية على أنتاج أنزيم البروتييز القاعدي والذي يعد احد عوامل الضراوة المهمة للبكتريا .

أختبرت العزلات المقاومة للكولستين للكشف الجيني عن مضخة الدفق MexXY ، وبعد ترحيل ناتج التضاعف في هلام الأكاروز 1% لوحظ ظهور حزمة واحدة في الحفر بالمستوى نفسه بعد تعريض الهلام للأشعة فوق البنفسجية , مما يدل على أرتباط الباديء مع التساسل المكمل له على شريط DNA القالب عند مقارنة الحزم المتضاعفة بالدليل الحجمي ذي الحزم المعروفة الأحجام كما في الشكل (1) جاءت هذه الحزم مماثلة الحجم وهو 250 زوج قاعدة تقريبا عند مقارنتها مع النتائج التي توصل اليها Hocquet وجماعته (14) .



الشكل (1) :الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR لبكتريا P.aeruginosaبأستعمال الباديء النوعي لجين mexy بعد صبغها بصبغة الأثيديوم بروماید وتعريضها للأشعة فوق البنفسجية . تركيز الهلام 1% ، الفولتية (50) فولت لمدة ساعه واحده , الدليل الحجمي المسار M 10kb .الارقام من 1-15 عزلات بكتريا P.aeruginosa.

أظهرت النتائج أن 74% من العزلات تمتلك الجينmexY, تتفق نتائج الدراسة مع ماتوصل اليه Morita وجماعته (24) ، أذ لاحظوا أن 39عزلة (45.9%) من عزلات P.aeruginosa تملك الجين mexY . تعمل مضخة الدفق على منح الخلايا البكتريه مقاومة متعددة لمدى واسع من المركبات مثل الكوينولونات ومركبات الامونيوم الرباعية وصبغة الإثيديوم بروماید والاكردين.

المصادر

1-Vianelli,N.; Giannini, M.B and Quartic , C .(2006). Resolution of Pseudomonas aueroginosa Outbreak in a haematology unit with the use of disposable sterile water filter . Haematol,J;91(7):983-985.

2-Landman, D.; Quale , J.M. ; Mayorga, D., et al.(2002). Citywide clonal Outbreak of multi-resistant Acinetobacterbaumanni and Pseudomonas aeruginosain Brooklyn ,N Y : the pre antibiotic era has returned .Arch. Intern. Med. 162 : 1515-1520 .

3-Vidaillac, C.; Benichou , L. and Duval , R.E.(2012). In vitro synergy of colistin Combinations against Colistn –Resistant Acinetobacterbaumanni, Pseudomonas aeruginosaand Klebsiella pneumonia isolates. Antimicrob.Agents Chemother. 56(9):4856-4861.

4-Lambert,P.A.(2002). Mechanisms of antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa . J .Royal.Soc .Med95: 22-26.

5-Falagas, M.E.; Kasiakou , S.K.(2005). Colistin : The revival of polymyxin for the Management of Multi-drug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. Clin. Infect. Dis. .editor Louis, D. and saravolatz .

6-Morita,Y. ; Sobel ,M.L. and Poole, K.(2006). Antibiotic inducibility of the MexXY multidrug efflux system , department of microbiology and immunology ,Queen's University , Kingston , Ontario ,Canada k7L 3N6.

7-Meletis ,G. and Bagkeri , M. (2013) . Pseudomonas aueroginosa :Multi –Drug-Resistance development and treatment options.edited by silpi basak .J.Med. Infect. Dis. ISNB 978-95351-1145

8-**Nass , T .; Zerbih , M.;Girlich, D .and Nordmann, P. (2003) .** Integration of transposon Tn-Encoded inhibitor resistant B –Lactamase Gene bla TEM-67 from proteus mirabilis , into the Escherchia coli chromosome . J. Antimicrob. Chemother. 47(1):19-20.

9-Forbes B.A. , Sahm D.F. and Weissfeld A.S.(2007) .Baily and Scotts:Diagnostic Microbiology".12th edition. Mosby,Inc. Baltimore, USA. p:266-277, 2007.

10-CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) .(2011). Performance standard for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-First informational supplement. M100-S21.31(1).

11-Mathur, T.; S. Singhal; S. Khan; D.J. Upadhyay; T. Fatma; and Rattan.A. (2006). Detection of biofilm formation among The clinical isolates of staphylococci: An evaluation of three different screening methods. Indian J. Med. Microbiol. 24(1):25-29.

12-Benson, H.G.(2002). Microbiological applications (Laboratory Manual in General Microbiology). Eighth edition published by McGraw –Hill, New York .

13-Atlas R.M.; Brown,A.E.; and Parks,L.C.(1995) Laboratory manual experimental microbiology. 1th ed. Mosby Yearbook, Inc. P: 888.

14-Hocquet, D.; Nordmann, P.; Gach, F.E.; Cabanne, L. and Plesiat, P.(2006). Involvement of the MexXY-OprM efflux system in emergence of cefepime resistance in clinical strains of Pseudomonas aeruginosa .American Soci.Microbiol. 50(4):1347-1351.

15-Mohanty,S.;Maurya,V.;Gaind,R.andDeb,M.(2013). Phenotypiccharacteriza- tion and colist inscsceptibillities resistance of Pseudomonas aeruginosa and Acienetobacter spp. . J.Infect. Dev. Ctries. 7(1):880-887.

16- محسن،مسلم عيدان .(2010). دراسة تأثيرالفوسفات في ضراوة بكتريياالزوائف الزنجارية خارج وداخل الجسم الحي .رسالةماجستير. كليةالعلوم . جامعةالكوفة .

17-**العبيدي , سوسن شوكت عبد عبد الله .(2002)** .تأثير مستخلصات قشور البرتقال على نشاط بكتريا Pseudomonas aeruginosa المقاومة للمضادات الحيوية والمعزولة من التهابات جروح الحروق وجروح ما بعد العمليات في مدينة بغداد , رسالة ماجستير , كلية العلوم , الجامعة المستنصرية .

18-**AL-Gherawi, R.S.(2009).**Effect of innamomum zeylanicum bark and apiumgraveolens seed on the antibiotic resistant bacteria isolated from UTI female patients (in vitro) .M.S.C., thesis College of Science .Al-Mustansiriya University .

19- النقيب ، بديع شرف الدين عزيز.(2008). العوامل المؤثرة في التوصيف الإنزيمي والقابلية الالتصاقية ومقاومة المضادات الحياتية للزوائف الزنجارية المعزولة من التهاب المجاري البولية .أطروحة دكتوراه .كلية العلوم . الجامعة المستنصرية

20- **الكعبي , مروة حسن عبد علي .(2011)** .تشخيص جينات CTX-M- , CTX-M-I, bla/ bla TEM SHV IIIبأستخدام تقنية التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا من بعض البكتريا السالبة لصبغة كرام . رسالة ماجستير . كلية العلوم – الجامعة المستنصرية .

21-**Wiles,T.J.; Kulesus,R.R.and Mulvey, M. A.(2008).**Origins and virulencemechanisms of uropathogenic Escherichia coli. Experimental and Molecular Pathology. 85(1): 11-19.

22-**Nagaveni , S.; Rajeshwari , H.; Ajay , K .and Kelmani , C.R.(2010).** Evaluation of bioflim forming ability of the multidrug resistance Pseudomonas aeruginosa ..Bio.Internat .J .sci.5(4):563-566.

23-**AL-Tikrity, A.L.(2009).**Bacteriological and genetical study of Pseudomonas aeruginosa isolated from different human infection. M.Sc. Thesis. College of Scince. University of Tikrit.

24-**Morita,Y.; Tomida, J. and Kawamura ,Y. (2012).** Primary mechanisms mediating aminoglycosides resistance in the multidrug –resistant Pseudomonas aeruginosa Clinical isolate PA7.Microbiology .158:1071-1083.