

## التصنيف العددي بالتحليل العنقودي للبيكتريا غير المخمرة المعزولة سريريا من إحدى مستشفيات بغداد

ليلى عبد الحميد سعيد ، منال خالد محمد  
الجامعة المستنصرية / قسم علوم الحياة/ كلية العلوم  
عادل عبيد حسوني  
الكلية التقنية/ المسيب

### الخلاصة

عزلت ونمطت (38) عزلة تعود لمجموعة البيكتريا غير المخمرة حيويًا وذلك اعتماداً على العدة API 20E والاختبارات المتممة لقراءتها، إذ تم اعطاؤها رقماً تساعياً حيويًا عرف بالمصطلح API Biopattern-2، وبالإستعانة بالشبكة الدولية للمعلومات ومن خلال القرص المدمج apiweb™V 1.1.0 اصدار كانون الثاني للعام 2006 تم الوصل لقاعدة البيانات الخاص بالشركة المنتجة للعدة مما مكّن من تشخيص هذه السلالات واعتماداً على هذه الانماط الحيوية إضافة لنتائج مثلت صفاتها الفسلجية وانماطها المصلية وانماط حساسيتها للمضادات الحيوية تم تصنيف العزلات عددياً وبالتحليل العنقودي وباستخدام معامل جاكارد ورسم مخطط شجري يوضح النسب المئوية للتشابه بينها، وتم الحصول على (4) عناقيد رئيسية تجمع في كل عقود منها اغلب العزلات التي تعود للنوع أو المجموعة الواحدة معاً وبمستويات تشابه مختلفة وسجلت عزلتان تعودان للنوع *Pseudomonasa aeruginosa* (Pa) وأخرتان تعودان للمجموعة *Pseudomonas fluorescens/ putida* (Pf/ p) اعلى مستوى تشابه بلغت  $S_j \geq 82.4\%$ . اما اعلى نسبة تشابه بين عزلتين تعودان لنوعين مختلفين فقد تشابهت عزلة تعود للنوع *Ochrobactrum anthrophi* (Oa) مع عزلة تعود لمجموعة spp. Non fermenter (Nf) بالنسبة  $S_j \geq 75.0\%$  واعتمدت مخططات الهجرة الكهربائية للبروتينات الذائبة الكلية باستخدام هلام متعدد الاكريلاميد بوجود SDS للحصول على نسق البروتينات الذائبة الكلية لخمس عزلات مختلفة من البيكتريا قيد الدراسة وتبين ان 60% منها تحمل حزماً بروتينية ذات وزن جزيئي تقريبي 73، 104، 167، كيلو دالتون.

### Abstract

Thirty eight isolates belonging to the non-fermenter bacilli were isolated and typed depending on the tests included on the API 20E kit and its complimentary tests, the isolates were given 9- digital bionumber known as Apibiopattern-2, by the use of Word Wide Web and through the compact disc named apiweb™ V 1.1.0 produced in January 2006 an access to the database that belongs to the company producing the kit were done, Which made the diagnosis of these isolates possible, depending on these biopattern plus the results represents its physiological, serotyping and its antibiogram, the isolates were classified numerically by cluster analysis by use of Jaccard's coefficient and a dendrogram were drawn showing the percentage of similarities between the isolates. Four main clusters were produced; each single cluster included most isolates belonging to single species or group in different similarity levels. Two isolates belonging to the species *Pseudomonas aeruginosa*, and two others belonging to the group *Pseudomonas fluorescens/ putida* recoded the highest similarity level ( $S_j \geq 82.4\%$ ). The highest similarity level between two isolates belonging to different species were recorded, one isolate belonging to the species *Ochrobactrum anthrophi* and the other belonging to the Non-Fermenter spp. showing ( $S_j \geq 75.0\%$ ). The bacterial total soluble protein profile for (5) different isolates under study were investigated by using SDS gel electrophoresis, 60% of the isolates seemed to harbour protein bands of approximate molecular weight 73, 104, 167 kD.

### المقدمة

تعرف البيكتريا غير المخمرة Non-fermenter بكونها مجموعة تصنيفية متجانسة تعود للقسم division *Protobacteria* والتي تضم اجناساً ليس لها القدرة على الايض الهدمي catabolize للكوكوز لذا فهي لا تستطيع أن تخمره ورغم ذلك نجد أن أنواعها تتمكن من القيام بالأيض الهدمي لسكريات أخرى، وتتصف هذه البيكتريا بكونها هوائية كروية إلى عصوية الشكل وغير مكونة للسبورات وسالبة لصبغة كرام وقد إزداد الاهتمام بهذه البيكتريا للزيادة الحاصلة بنسب عزلها من النماذج السريرية فمنها ما يصيب الإنسان كمرض انتهازى محدثة عدد من الاصابات، وظهرت العديد من عزلاتها مقاومتها المتعددة للمضادات الحيوية المستخدمة لعلاج الاصابة به، ( Todars, 2009 ) ولتداخل صفاتها نجد أن الحالة التصنيفية لأفرادها غير مستقرة، فعلى سبيل

المثال لا الحصر فإن النوع الجديد *Ochrobactrum anthropi* يعد ذو صلة بالأجناس (*Brucella* ) و *Achromobacter, Alcalagenes* واعضاء العائلة *Pseudomonadaceae* والجنس *Brucella* ( Lubuhn et al , 2000 ; Velasco et al , 1998 ) ومن هنا جاءت هذه الدراسة التي هدفت لتسليط الضوء على مدى القرابة بين الأفراد التي تعود لهذه المجموعة والمعزولة محلياً وذلك من خلال دراسة اوجه الشبه والاختلاف بين عزلاتها.

#### المواد وطرائق العمل:

النماذج: جمع (278) نموذجاً سريريّاً وذلك من المرضى الكبار ومن كلا الجنسين الراقدين والمراجعين لمستشفى الكندي التعليمي للفترة من آيار إلى حزيران من عام 2010.

التشخيص والتنميط الحيوي باستخدام العدة **API 20E**: امكن جمع عزلات تعود للبكتريا غير المخمرة باستخدام المعايير العامة المقبولة و حسب ( Goldman and Green , 2009 ) ثم نمطت هذه العزلات اعتماداً على العدة **API 20E**, إذ لقت حسب تعليمات الشركة المجهزة ( bio Mérieux, Marcy L'Étiolle, France ) بكل عزلة وبمكررين, حملت العزلات رقماً حيوياً سباعياً **digital numbers** -7 خاصاً بالعزلة عرف بالتسمية (1) **ApiBiopattern**, تمثل نتائج الاختبارات العشرون الخاصة بالعدة, وبما أن العزلات تعود لمجموعة البكتريا غير المخمرة ولغرض التعرف عليها بشكل أدق وحسب تعليمات الشركة المجهزة للعدة فقد اجريت اختبارات متممة لقراءة العدة وتشمل اختبارات اختزال النترات إلى نترت و انتاج غاز  $N_2$  والقدرة على النمو بوسط ماكونكي وقدرة العزلة على اكسدة أو تخمر الكوكوز وحضرت الاوساط الخاصة بهذه الاختبارات كما واجري اختبار الحركة باستخدام شريحة القطرة المعلقة وذلك لكون البكتريا قيد الدراسة هوائية إجبارية وبإضافة نتائج هذه الاختبارات وضع رقم حيوي تساعي **digital number** -9 لتحمل العزلات النمط الحيوي **ApiBiopattern** -2 تم الاستعانة ببرمجيات التشخيص المحفوظة على قرص مدمج **Compact Disc (CD)** يحمل التسلسل **api webTmV1.1.0** إصدار كانون الثاني للعام 2006 وربط بالشبكة الدولية للاتصالات ليتصل بقاعدة بيانات **database** الشركة المنتجة للعدة لتشخيص الارقام التساعية التي لا يفسرها الدليل المطبوع اذ انه يفسر الارقام السباعية فقط.

الحساسية للمضادات الحيوية: استخدمت طريقة **Bauer-Kirby** وحسب ما وصفت ( Bauer et al , 1966 ), لاختبار حساسية العزلات للمضادات الحيوية والمزودة من شركة (Turkey/ Bioanalyse) **gentamicin , meropenem , ticarpenicillin , ampicillin** , استخدمت المضادات التالية: **tetracyclin , carbenicillin , cefoxitin , amikacin , ciprofloxacin** وفسرت النتائج حسب ( NCCLS, 2007 ).

التنميط المصلي: اخضعت العزلات للتنميط المصلي وذلك باستخدام احد الامصال المضادة الاحادية التكافؤ الستة عشر للمستضد الجسمي **O** الخاص بعزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* والمزود من شركة (France, Sanofi, Diagnostic Pasteur).

تصنيف العزلات بطريقة الترحيل الكهربائي لبروتينات الذائبة الكلية: استخدمت مخططات الهجرة الكهربائية للبروتينات الذائبة الكلية وباستخدام هلام عديد الاكريلاميد بوجود (SDS)، وحسب ما ورد

في (Laemmli,1970) ولغرض تعيين الاوزان الجزيئية التقريبية للحزم البروتينية لعزلات خمس تعود للبكتريا غير المخمرة اختيرت لتمثل مختلف الاجناس والمجاميع المختلفة من البكتريا المعزولة ولغرض تعيين الاوزان الجزيئية للحزم البروتينية تم الاستعانة ببرمجيات Photo CaptMolecular Weight Software ( Photo capt,2001 ).

**التحليل الاحصائي:** استخدم من Weighted Average Linkage لغرض التحليل العددي Numerical Analysis للناتج بشكل شجري هرمي Hierarchial Dendrogram اضافة لاستخدام الربط المنفرد للمجاور الاقرب Nearest Neighbour Single Linkage لتحليل النتائج وقد استخدم معامل جاكارد Jaccard's Coefficient (Sj) Coefficient كعامل تشابه Coefficient of Resemblance بتطبيق النظام الإحصائي SPSS في الحاسبة.

### النتائج والمناقشة

يوضح الجدول (1) نتائج تشخيص البكتريا غير المخمرة وفق نظام API 20E والاختبارات المتممة لها ويقارن كفاءة التشخيص عند استخدام (1) ApiBiopattern (2) ApiBiopattern. واعتماداً على (2) ApiBiopattern تم الحصول على (38) عزلة تعود لأجناس مختلفة من البكتريا غير المخمرة. وبمقارنة كفاءة التشخيص عند استخدام (1) ApiBiopattern (2) ApiBiopattern نجد ارتفاع في كفاءة التشخيص عموماً سواء من ناحية ارتفاع مستوى التشخيص (ID) أو من ناحية زيادة عدد العزلات المشخصة لمستوى النوع والجنس عند استخدام (2) ApiBiopattern عنه عند استخدام (1) ApiBiopattern ويلاحظ من الجدول (1) ارتفاع مستوى تشخيص (ID) عزلات وعددها 33 (87%) وبضمنها عزلتان (5%) والتي لم يسبق وإن شخصتا باستخدام (1) ApiBiopattern, وشذ عن ذلك 5 (13%) من العزلات والتي أبدت انخفاضاً طفيفاً بمستوى التشخيص عند استخدام (2) ApiBiopattern عوضاً عن (1) ApiBiopattern, وعلى ضوء النتائج التي تم الحصول عليها تبين أن الاستعانة بالنمط (1) ApiBiopattern أدى لتشخيص 29 (76%) من العزلات مشخصة لمستوى الجنس فيما لم تشخص بقية العزلات 9 (24%) بصورة دقيقة بل وضحت المجموعة التي تنتمي اليها فقط, أما عند الاستعانة بالنمط (2) ApiBiopattern ف لوحظ زيادة في اعداد العزلات المشخصة لمستوى النوع والجنس ليصبح 32 (84%) وتشمل 23 (61%) لمستوى النوع و(23%) لمستوى الجنس، ولم تشخص 6 (16%) من العزلات بصورة دقيقة بل وضحت المجموعة التي تنتمي لها، وقد تم قبول التسمية المقترحة كاختيار أول في التشخيص سواء كانت درجة التمييز discrimination ممتازة أو جيدة جداً أو ضعيفة علماً أن درجة التمييز الضعيفة تشير إلى احتمالية اقل من 90% وهو أمر مقبول وحسب العديد من المصادر ومنها (Wauters et al,1995). أبدت اغلب العزلات وعددها 26 (68.4%) مستوى تشخيص تراوح ما بين الممتاز والجيد جداً والجيد فيما أبدت إحدى عشرة (28.9%) عزلة فقط مستوى تشخيص مقبول وعزلة واحدة (2.6%) مستوى تشخيص مشكوكاً بامره إلا أنه مقبول فتفاعلاتها الحيوية صحيحة إلا أنها تحمل رقماً لا يوجد مثله في قاعدة معلومات الحاسبة الخاصة بالشركة المنتجة للعدة وقد يعود ذلك لاختلافها عن عزلات مثالية typical isolates بتنتيجة تفاعل أيضي واحد نادر التكرار وأن ما حصل عليه هو رقم صحيح وملزم valid ولكنه غير موجود, ويلاحظ أن بعض العزلات قد

شخصت لمستوى الجنس Genus واخرى لمستوى النوع species فيما يحتاج تشخيص البعض منها لهذين المستويين لاجراء المزيد من الاختبارات خارج نطاق هذا النظام، وقد اعطيت للعزلات رموزاً ورقاماً.

جدول (1) مقارنة بين التشخيص والنسبة المئوية لصحة باستخدام ApiBiopattern-1, AipBopattera-2

No.	الارقام السباعية والتساعية	التشخيص بالأرقام السباعية	صحته (%)	مستوى التشخيص	التشخيص بالأرقام التساعية	صحته (%)	مستوى التشخيص
1	0 000 002(41)	Po. Ab	81.2	Acc. id.	Po Oa 43.6 Nf .spp	49.6 43.6 4.5	LD
2	0 000 004(63)	Nf. spp. ; Oa B/A/M	32.1 25.4 24.5	LD	Oa Nfspp Pa	62.5 37.0 0.3	LD
3	0 001 006(61)	Oa	80.3	Acc.id	Oa Nf spp. B/A/M	94.8 5.1 0.1	G.
4	0 002 004(23)	Unid.			Nf spp. Pa Ci	50.5 31.9 9	LD
5	0 002 004(63)	Unid.			Nf spp. Pa Oa	75.1 23.3 1.2	LD
6	0 004 004(63)	Nf. Spp P/p/M/h A/s/S Bc	31.8 20.7 19.4 11.9	LD	Nf spp. Oa Pa Bc	77.0 14.4 8.1 0.1	LD
7"8	0 006 006(63)	Bc Pa Pf/p	66.3 15.6 14.7	LD	Pa Nf spp.	98-3 0.1	G.
9	0 010 004(51)	Oa M/C B/ A /M. spp P.spp.	33.0 31.0 15.5	LD	B/A/M Oa Nf spp. Sp	63.0 34.6 2.2 0.1	LD
10	0 200 004(01)	B/A /M. spp Nf spp. Oa P.spp.	38.7 27.7 16.0	LD	M/C B/A/M Nf spp.	51.9 45-8 1.3	LD
11 12 13	0 201 000(43)	Po B/A/Mspp Nf spp. Oa Ab P.spp.	88.1 5.9 3 2.5	LD	Po Nf	89.8 0.5	G.
14	0 201 004(51)	B/ A /M. spp Nf spp. Oa Pf/ p P.spp.	59.8 22.7 13.2 3.6	LD	B/A/M Nf spp. Oa Pf/p	82.5 12.3 4.3 0.2	LD
15	2 000 004(43)	Pf/ p A/s/S	54.0 33.2	LD	Pf/ p Pa	93.7 4.6	G.

مجلة جامعة بابل / العلوم الحرفية والتطبيقية / العدد (4) / المجلد (22) : 2014

16	2 000 004(51)	Pf/ p A/s/S	54.0 33.2	LD	Pf/ p Nf spp. B/A/M	61.0 31.4 5.4	LD
17	2 000 004(53)	P.spp. Pf/ p A/s/S	54.0 33.2	LD	Pf/p Nf spp.	93.8 3.9	G.
18, 19	2 000 004(63)	P.spp. Pf/ p A/s/S	54.0 33.2	LD	Pa Nf spp. Oa	85.0 11.8 1.8	LD
20	2 002 004(53)	A/s/S Pf/ p Pa Cv	71.7 14.8 10.2 2.7	LD	Pf/ p Pa Cv	84.7 12.8 0.9	G. id. to the Genus
21	2 004 004(53)	A/s/S Pf/ p	52.3 28.6	LD	Pf/p Pa	91.8 5.2	G.
22	2 004 006(23)	Pf/ p Pa	72.9 25.2	G. id. to the Genus	Pa Pf/p	99.8 0.1	G.
23	2 004 006(53)	Pf/ p Pa	72.9 25.2	G. id. to the Genus	Pf/ p Pa Bc	92.6 7 0.1	V.g. to the Genus
24	2 006 006(43)	Pa Pf/ p	68.2 25.0	G. id. to the Genus	Pa Pf/ p Bc	60.5 39.3 0.1	V.g. to the Genus
25	2 006 006(53)	Pa Pf/ p	68.2 25.0	G. id. to the Genus	Pf/ p Pa Vf	61.7 37 0.5	G. id. to the Genus
26	2 006 004(53)	Pf/ p Pa	75.2 23.2	G. id. to the Genus	Pf/ p Pa Nf	58.2 41.2 0.3	Doubtful profile
27	2 200 006(63)	Pf/ p Pa	70.7 29.1	V. g. to the Genus	Pa Pf/ p	99.6 0.3	V.g.
28	2 200 046(63)	Pf/ p Pa	87.8 12.1	Exc.id. to the Genus	Pa Pf/ p	89.9 1.0	G.
29	2 202 004(43)	Pa Pf/ p Cv	67.1 27.5 5.0	LD	Pa Pf/p /Cv	57.7 42 0.1	V.g. to the Genus
30	2 202 044(23)	Pf/ p Pa	54.9 45.0	Exc.id. to the Genus	Pa Pf/p	99.9 0.1	V.g.
31	2 202 044(63)	Pf/p Pa	54.9 45.0	Exc.id. to the Genus	Pa Pf/p	99.8 0.1	V.g.
32	2 203 044(63)	Pf/p Pa	92.4 7.5	V. g.id. to the Genus	Pa Pf/p	98.9 0.5	G.
33	2 204 004(43)	Pf/p Pa Cv	46.9 43.1 9.6	LD	Pf/p Pa Cv	65.7 34 0.1	V.g.
34	2 206 046(23)	Pa Pf/p	76.4 23.5	V g. id to the	Pa Pf/f	99.9 0.1	Exc.

				Genus			
35							
36	2 206	Pa	99.9	Exc. id.	Pa	99.9	Exc.
37	046(63)	Pf/p	0.1		Pf/p	0.1	
38							

Symbols: Possibility of *Brucella* spp.(Ba.), *Pasteurella pneumoniae*/ *Mannheimia haemolytica* (Pp/Mh), *Burkholderia cepacia* (Bc). Possibility of *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* (Ab/c) *Aeromonas salmonicida* sp. *Ssalmonicida* (A/s/S) *Chromobacterium violaceum* (Cv). *Pseudomonas aeruginosa* (Pa). *Pseudomonas fluorescens/putida* (Pf/p). *Pseudomonas oryzae* (Po). *Bordetella/ Alcaligenes/ Moraxella* spp (BAM). *Ochrobactrum anthropi* (Oa). Non-fermenter spp.(Nf). *Myroides/Chryseobacterium indologenes*(M/C). Identification according to API 20E kit excellent (Exc.) 99.9, very good (V.g.)% > 99, good (G>90%), acceptable (Acc.) > 80%, Low discrimination (LD)>50%, unid. = unidentified

ويوضح جدول (2) الانماط الحيوية التي وقعت ضمنها العزلات، وبما إن جميع العزلات ابدت ايجابيتها لاختبار McC وسليبيتها لاختبارات ONPG و LDC و ODC و H<sub>2</sub>S و TDA و IND و MAN و INO و SOR و RHA و SAC و AMY و OF-F، فأن العزلات وقعت ضمن (31) نمطاً حيوياً، جاء توزيع العزلات ضمن هذه الأنماط نتيجة للاختلافات التي ايدتها في نتائج الاختبارات (المتبقية) الخاصة بنظام API 20E والاختبارات المتممة لقراءتها ويمكن الرجوع لما تشير لها هذه الرموز للكتيب الملحق بالعدة.

### جدول(2). نتائج التفاعلات الكيموحيوية التي بموجبها اختلفت الانماط الحيوية للبكتريا غير المخمرة

Isolates	ApiBiopattern -2	ADH	CIT	UR E	VP	GEL	GLU	MEL	ARA	OX	NO2	N2	MO B	OF-O	patte rn
OA2	0000004 63	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
Pa1	0000002 41	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	2
Nf6	0004004 63	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	3

Nf4	0002004 23	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	4
Nf5	0002004 63	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	5
Pa7, Pa8	0006006 63	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	6
Ca3	0001006 61	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	7
BA/M9	0010004 51	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	8
M/c10	0200004 01	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	9
Po11, Po12, Po13	0201000 43	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	10
B/A/M14	0201004 51	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	11
Pf/p15	2000004 43	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	12
Pa18, Pa19	2000004 63	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	13
Pf/p16	2000004 51	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	14
Pf/p17	2000004 53	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	15
Pf/p21	2004004 53	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	16
Pa22	2004006 23	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	17
Pf/p23	2004006 53	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	18
Pf/p20	2002004 53	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	19
Pa24	2006006 43	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	20
Pf/p25	2006006 53	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	21
Pf/p26	2200004 03	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	22
Pa27	2200006 63	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	23
Pa28	2200046 63	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	24
Pf/p33	2204004 43	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	25
Pa29	2202004 43	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	26
Pa31	2202044 63	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	27
Pa30	2202044 23	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	28
Pa34	2206046 23	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	29
Pa35, Pa36, Pa37,	2206046 63	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	30
Pa32	2203004 63	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	31

\*يشير 1 الى ايجابية الاختبارات و 0 لسليتها

التنميط بالطرز المظهرية لإنتاج الصبغات: يعد لون المستعمرات والصبغة التي تنتشر في الوسط المحيط بها سمة مميزة للعديد من الممرضات عندما تنمى في المختبرات السريرية وتستهلك هذه الصبغة لتشخيصها ( Liu and Nizet,2009). أمكن وحسب الجدول (3) تقسيم العزلات ما بين (19) من الانماط للطراز المظهرية لإنتاج الصبغات ورمز لهذه الإنماط الحروف الابجدية من A ولغاية S, توزعت العزلات التي تعود للنوع Pa ما بين (13) نمطاً ومن المعلوم أن معظم سلالات هذا النوع تنتج صبغة زرقاء دائبة في الماء والكلورفورم وغير فلورسينية تعرف بالتسمية pyocyanin وتنتشر هذه الصبغة في الاوساط المحيطة بالبكتريا, كما وقد تنتج صبغة صفراء فلورسينية دائبة في الماء تعرف بالتسمية pyrubin واخرى بنية سوداء في الماء أيضاً تعرف بالتسمية pyomelanin ( Ferguson and Chill,2007 ). أما عزلات مجموعة pf/p فتوزعت ما بين (6) انماط, ومن المعلوم أن السلالات التي تعود لهذه المجموعة لها القدرة على انتاج صبغة صفراء-مخضرة فلورسينية ( Silva and Almeida,2006 ) وتمثلت عزلات Po الأربع جميعاً بنمط غابت عنه الصبغات التي تنتشر في الوسط إلا أنها تميزت بإنتاج صبغة صفراء غير دائبة في الماء تلونت بها المستعمرات وحسب ما أشار ( Kodama et al,1985 ). وتمثلت مجموعة Nf بثلاث انماط أما عزلتا مجموعة B/A/M وعزلتا Oa والعزلة M/C فتمثلت بالنمط الذي غابت عنه الصبغات وهي من سمات هذه المجاميع وحسب ( Forbes et al ,998 ).

جدول(3) انماط الطرز المظهرية لاننتاج الصبغات من قبل البكتريا غير المخمرة

Isolates	Pigments							Pigments Patterns
	G	Y	B	R	g	yf	Yi	

Oa 2, Oa 3, B/A/M 9, M/c 10, B/A/M 14, Pf/p 33	0	0	0	0	0	0	0	A
Pf/p 20	1	0	1	0	0	0	0	B
Nf 6	1	1	1	0	0	0	0	C
Pa 24	1	0	1	1	0	0	0	D
Pa 28	1	0	0	0	1	0	0	E
Pf/p 16, Pa 18, Pa 19, Pf/p 21, Pa 31	1	0	1	0	1	0	0	F
Pa 34	1	0	0	1	1	0	0	G
Pf/p 17, Pf/p 23, Pf/p 26, Pa 29	0	0	0	0	0	1	0	H
Pf/p 25, Pa 38	1	0	0	0	0	1	0	I
Pa 22	0	0	1	0	0	1	0	J
Pa 27, Pa 30, Pa 37	1	0	1	0	0	1	0	K
Pa 35	0	1	1	0	0	1	0	L
Pf/p 15	1	1	1	0	0	1	0	M
Nf 5	0	0	0	1	0	1	0	N
Nf 4, Pa 36	1	0	1	1	0	1	0	O
Pa 32	1	0	1	0	1	1	0	P
Pa 8	1	1	1	0	1	1	0	Q
Pa 7	1	0	1	1	1	1	0	R
Po 1, Po 11, Po 12, Po 13	0	0	0	0	0	0	1	S

\*يشير 1 الى ايجابية الاختبارات و 0 لسليبيتها

symbols: Green (G), Yellow (Y), Brown (B), Red on trypticase soy agar  
Green(g), yellow fluorescent (YF) on king A and B agar, Yellow colony (Yi) on t trypticase soy agar

**التنميط المصلي:** قسمت العزلات حسب استجابتها للتنميط المصلي إلى خمسة مجاميع وحسب جدول (4) شملت المجموعة رمز لها بالحروف اللاتينية الصغيرة من (i) ولغاية (v) العزلات التي لم يتمكن من تنميطها سيروولوجياً (NAG) non-agglutinable أما بقية المجاميع ما بين (v-i) فقد نمطت سيروولوجياً والتي تبين انها تعود للانماط O:1 و O:11 و O:12 و O:16 وغابت بقية الانماط الاثني عشرة المتبقية، وظهرت الدراسة بأن النمط المصلي O:1 هو الأكثر تردداً وتعود له (10) عزلات أي حوالي (43.5%) من العزلات المنمطة يليه النمط المصلي O:16 وتعود له (8) عزلات أي حوالي (34.8%) من العزلات المنمطة، واخيراً النمط O:11 والذي بدأ أقل تردداً فتبعته عزلتان فقط أي حوالي (8.7%) من العزلات المنمطة، جاءت نتيجة هذه الدراسة مشابهة بعض الشيء لما وجدته مجموعة (Bouhaddioi et al,2002) في تونس إذ استعانوا بذات المصول المضادة المستخدمة في هذه الدراسة وتبين لهم أن عزلات Pa قيد دراستهم تعود لأربع عشر نمطاً وأن النمط O:1 (20%) هو السائد ثلثه الانماط O:6 (1.1%) و O:4 (12%) و O:11 (10%) فبقية الانماط ونسب تراوحت ما بين (1-5%) ومن هنا نلاحظ أن تردد النمطان O:1 و O:11 مقارب لما وجدته هذه الدراسة، كما وظهرت الدراسة أن من بين عزلات Pa عزلتان أي حوالي (11.8%) لم يتمكن من تنميطها وهما العزلتان Pa8 و



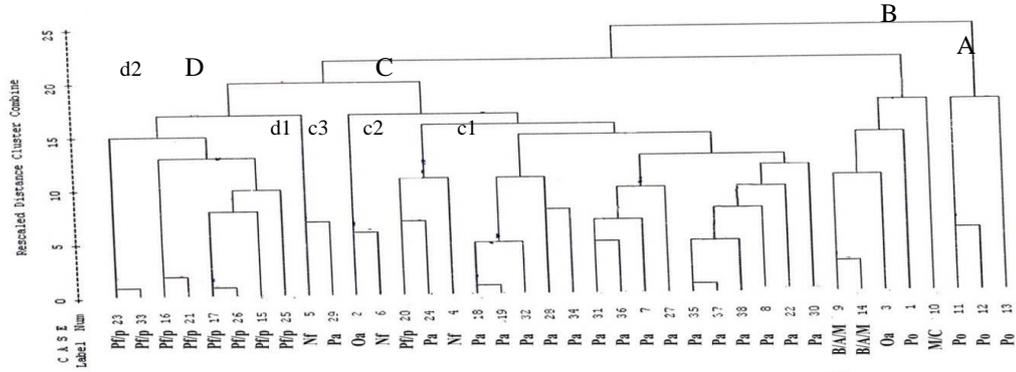
Po12	1	0	0	1	0	0	0	0	0	b
Pa 27	1	1	1	1	0	0	0	1	0	c
Po 13	0	1	1	0	0	1	1	1	0	d
Nf 4, Pa8, Pa 19, Pf/p 20, Pa 22 Pa32, Pa 34, Pa 35, Pa 37	1	1	1	1	0	0	0	0	1	e
Pa 24, Pa 30	1	1	1	1	1	0	0	0	1	f
Pa 18, Pf/p23, Pf/p33	1	1	1	1	0	0	1	0	1	g
M/C 10	0	1	1	1	0	0	0	1	1	h
Oa 3	1	1	1	1	0	0	0	1	1	i
Oa 2, Nf 6	1	1	1	1	1	0	0	1	1	j
Pa 7, B/A/M 9, B/A/M 14 Pf/p 15, Pa 28, Pa 38	1	1	1	1	0	0	1	1	1	k
Pf/p 16, Pf/p 17, Pf/p 21, Pf/p 26	1	1	1	1	1	0	1	1	1	l
Po 1, Nf 5, Pa 29, Pa 31	1	1	1	1	0	1	1	1	1	m
Pf/p25, Pa 36	1	1	1	1	1	1	1	1	1	n

\*يشير 1 الى ايجابية الاختبارات و 0 لسليتها

symbols: ampicillin(AM)10 mg, ticarpenicillin (Tic)75mg, meropenem (MEM)10 mg, gentamicin(GM)10 mg, tetracyclin (TE) 10 mg , carbenicillin (PY)100mg, cefoxitin (Fox)30mg, amikacin (AK)30 mg, ciprofloxacin (CF) 5mg

**المخططات الشجرية الهرمية لعزلات مجموعة البكتريا غير المخمرة حسب التحليل العددي-1:** يمثل الشكل (1) المخطط الشجري الهرمي لعزلات البكتريا غير المخمرة والذي تم الحصول عليه بالربط المنفرد للمجاور الاقرب وباستخدام معامل جاكارد ويوضح الشكل ان العزلات الثمان والثلاثون قد ترتبت تحت 4 عناقيد (clusters) رئيسية رمز لها بالابجدية من A إلى D إضافة لترتيب العزلات ضمن عدد من العناقيد الفرعية وذلك اعتماداً على 2 apibiopattern وصفاتها الفسلجية ونتائج تميظها بالطرز المظهرية لإنتاج الصبغات وانماطها المصلية وانماط مقاومتها للمضادات الحيوية المدروسة. مجموعة العزلات للعنقود الرئيسي A: ضم العنقود A عزلات عددها (3) تعود جميعاً للنوع Po والتي ارتبطت عند مستوى تشابه ( $S_j \geq 54.6\%$ ) وسجلت العزلاتان Po11 و Po12 أعلى نسبة تشابه بلغت ( $S_j \geq 75.0\%$ ) فيما تشابهت العزلاتان Po11 مع العزلة Po13 بالنسبة ( $S_j \geq 58.6\%$ )، مجموعة العزلات للعنقود الرئيسي B: ضم العنقود الرئيسي B خمسة عزلات ارتبطت بمستويات تشابه ( $S_j > 53.9\%$ ) وارتبطت ضمن هذا العنقود عزلتا مجموعة B/A/M تشابه ( $S_j \geq 78.6\%$ ) ارتبطت العزلة Po1 مع العزلة Oa3 بمستوى تشابه ( $S_j > 63.6\%$ ) وارتبطت العزلة M/C10 والعزلة Po1 بمستوى تشابه ( $S_j > 59.4\%$ )، مجموعة عزلات العنقود الرئيسي C: ضم العنقود الرئيسي C عشرون عزلة ارتبطت بمستوى تشابه ( $S_j > 47.6\%$ ). ويقع ضمنه عدداً من العناقيد الفرعية إذ ارتبطت اغلب عزلات Pa ضمن العنقود الفرعي C1 والذي ترتبط عزلاته فيما بينها بمستوى تشابه ( $S_j \geq 59.1\%$ )، وبلغت أعلى نسبة تشابه بين عزلات هذا العنقود الفرعي ( $S_j \geq 82.4\%$ ) وبذلك بين العزلتين Pa19 و Pa18 تلتها النسبة ( $S_j \geq 81.2\%$ ) بين العزلتين Pa37 و Pa35، أما العنقود الفرعي (C2) فضم (3) عزلات أولها لمجموعة Nf وثانيتها للنوع Pa وثالثتها لمجموعة pf/p فقد ارتبطت عزلاته بمستوى تشابه ( $S_j > 66.7\%$ ) وسجلت العزلة Pa24 والعزلة pf20 مستوى تشابه ( $S_j > 73.7\%$ ) ضمن هذا العنقود، هذا وارتبطت عزلتا العنقود الفرعي (C3) واللذان يعودان للعزلة Nf6 ومجموعة Oa2 بنسبة تشابه ( $S_j > 75\%$ )، مجموعة عزلات العنقود الرئيسي D: ضم العنقود الرئيسي D عشرة عزلات المستوى تشابه ( $S_j > 57.1\%$ )، ووقع ضمن هذا العنقود عنقودان فرعيان هما d1 و d2، ضم العنقود الفرعي d1 عزلتان تعود احدهما Pa29 والاخرى Nf5 وبمستوى تشابه ( $S_j > 73.7\%$ ) فيما بينهما كما ارتبطت اغلب (9/8) عزلات مجموعة pf/p ضمن العنقود الفرعي d2 وبمستوى تشابه

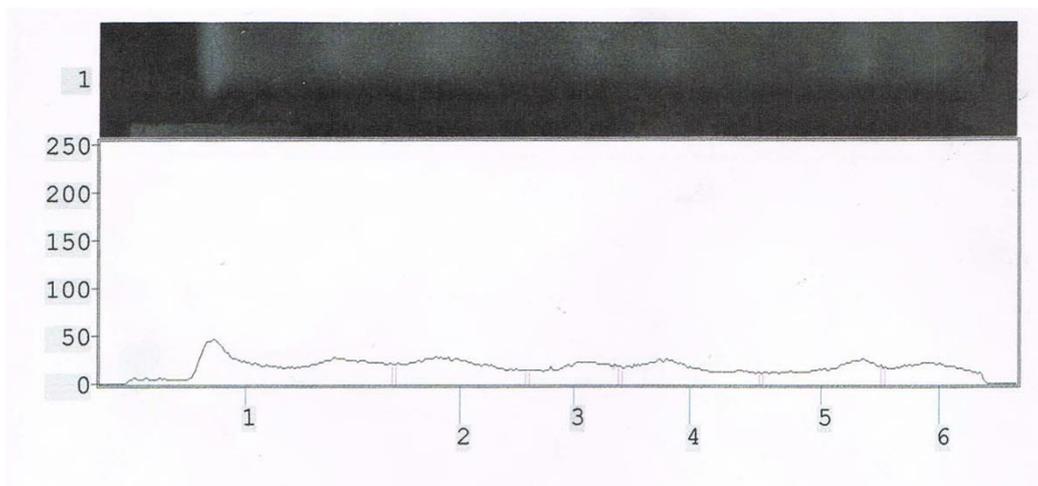
(Sj>65.2%), وبلغت اعلى نسب التشابه بين عزلات هذا العنقود (Sj>82.4%) وكذلك بين العزلتين pf/p26 و pf/p17 وسجلت نفس النسبة بين العزلتين pf/p33 و pf/p23. كما بلغت نسبة تشابه العزلتان pf/p16 نسبة (Sj>80.0%)(Oberhofer et al,1977; Favero et al, 1971).



شكل (1). المخطط الشجري الهرمي لعزلات مجموعة البكتريا غير المخمرة والتي تم الحصول عليها بالتحليل العنقودي وباستخدام الربط المنفرد للمجاور الاقرب وباستخدام معامل جاكارد واعتماداً على صفاتها الفسلجية وانماطها الحيوية والطرز المظهرية لانتاجها للصبغات وانماطها المصلية وانماط مقاومتها للمضادات الحيوية.

#### نسق البروتينات الذاتية الكلية:

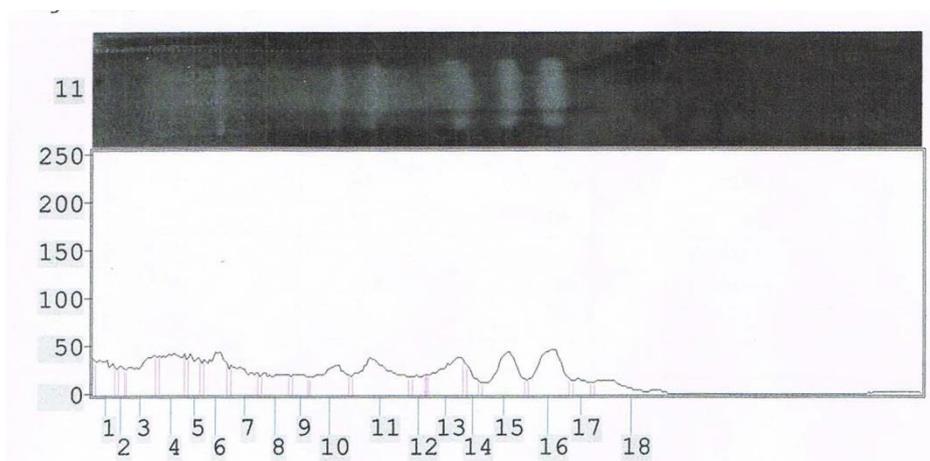
توضح الاشكال(2-7)نسق البروتينات الذاتية الكلية لعزلات خمسة من البكتريا غير المخمرة منتخبة من عناقيد مختلفة حسب التحليل العددي-1 كما ظهر في هلام متعدد الاكريلاميد بوجود SDS كما توضح المخططات البيانية schematic diagram المرافقة لهذه الاشكال انماط هذه النسق كما وتشير الجداول(6-11) للمؤشرات الكمية quantitative parameters لتلك البروتينات ومنها يتضح انفصال الحزم بحسب اختلاف اوزانها الجزيئية وتوضح مدى قرابة افراد هذ المجموعة اذ اشتركت 40% من العزلات باظهار حزم ذات اوزان جزيئية تقريبية بلغت 305,324,329, 89, 116, 144, 146, 198, 217 كيلو دالتون. كما اشتركت 60% منها باظهار حزم ذات اوزان جزيئية تقريبية بلغت 73, 167, 104 كيلو دالتون. وهذا يتفق مع دراسته اجراها (Durrani et al,2008).



الشكل (2). نسق البروتينات القياسية

جدول (6). المؤشرات الكمية للبروتينات القياسية

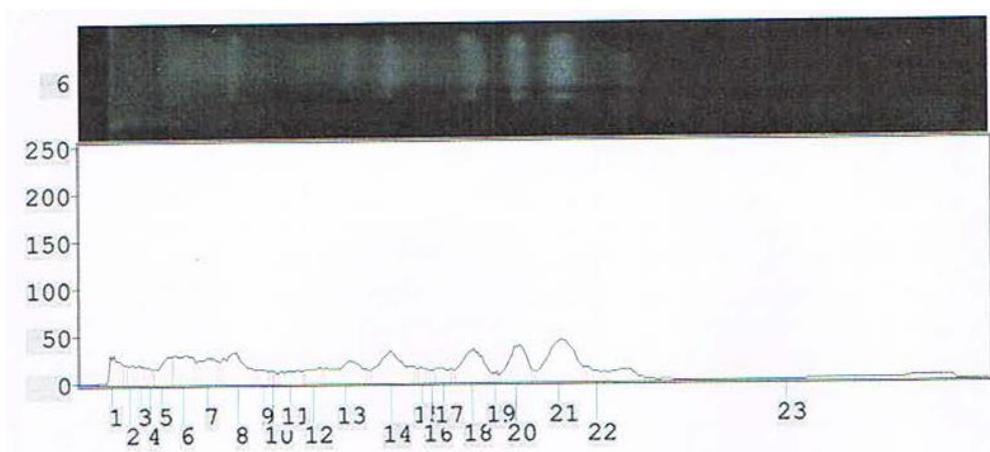
Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.	Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.
1	171197	81	9332		230.000	4	80080	77	4392		67.000
2	93390	73	4148		150.000	5	67633	67	3782		20.000
3	56187	77	2867		80.000	6	59582	61	3477		14.000



الشكل (3). نسق البروتينات الذاتية الكلية للعزلة Pa28

جدول (7). المؤشرات الكمية لبروتينات العزلة Pa 28

Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.	Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.
1	22301	73	671		357.458	10	30897	73	1281		194.009
2	7024	53	244		343.898	11	49286	85	1830		168.321
3	31966	75	976		323.559	12	9686	61	488		134.128
4	34884	75	854		311.356	13	34745	79	1159		116.619
5	16527	75	427		296.441	14	9505	71	427		110.056
6	30223	85	793		277.458	15	37955	87	1403		89.387
7	23394	59	915		261.186	16	43958	97	1342		78.911
8	19183	53	915		244.915	17	9120	31	610		73.734
9	11275	57	549		214.711	18	19722	27	2379		67.802

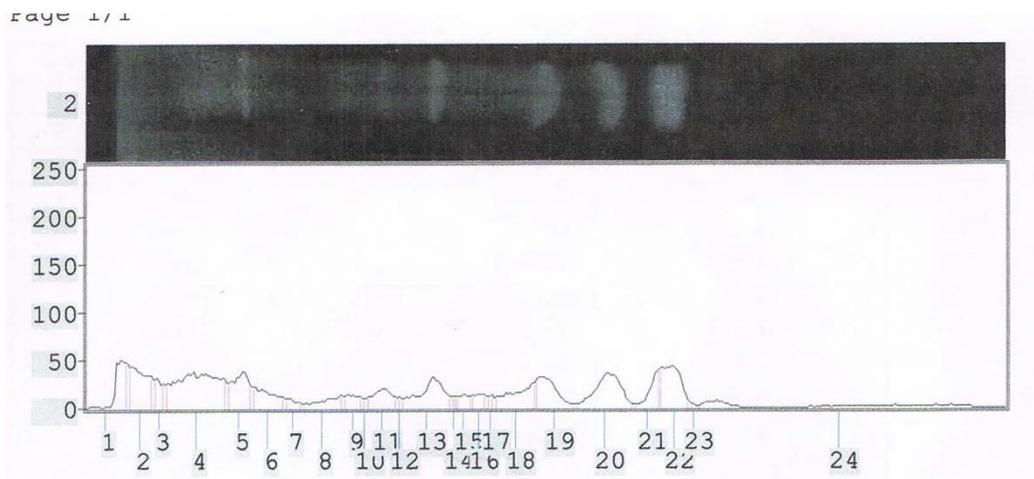


الشكل (4). نسق البروتينات الذاتية الكلية للعزلة Po11

جدول (8). المؤشرات الكمية للعزلة Po11

Page 1/1

Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.	Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.
1	13540	67	744		404.694	13	25569	65	1426		198.895
2	4942	53	248		393.265	14	32831	81	1488		167.838
3	6066	39	310		385.102	15	4729	53	310		146.571
4	3207	37	186		372.041	16	2478	45	186		137.475
5	14289	55	620		355.714	17	7984	51	558		127.442
6	22024	71	744		347.551	18	28072	83	1178		113.654
7	17752	65	682		329.592	19	1775	37	186		103.898
8	28661	75	1178		305.102	20	26703	87	1054		92.733
9	5334	45	372		280.612	21	46841	101	1612		80.485
10	1542	45	124		267.551	22	7764	47	682		77.619
11	11235	43	868		243.061	23	36523	33	11532		73.725
12	8320	51	558		230.000						

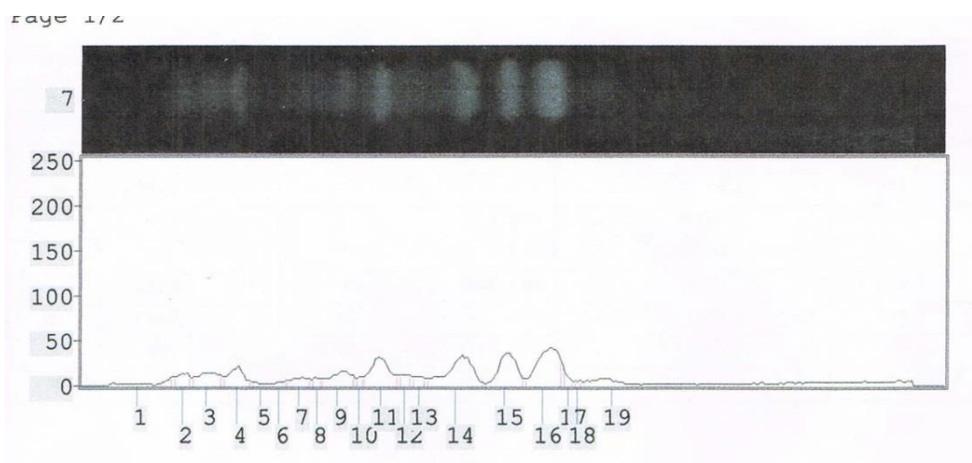


الشكل (5). نسق البروتينات الذاتية الكلية للعزلة Nf4

جدول (9). المؤشرات الكمية للعزلة Nf4

Page 1/1

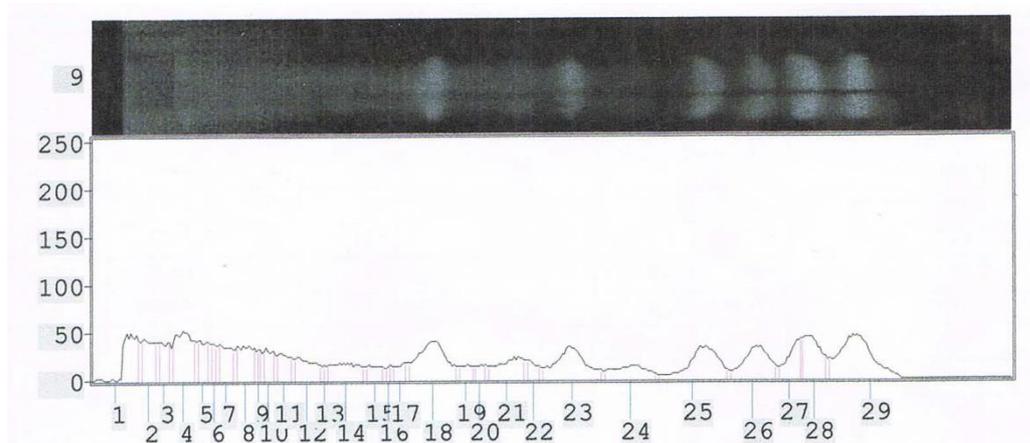
Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.	Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.
1	21653	79	1363		404.694	13	29510	73	1550		144.288
2	28672	81	744		396.531	14	1562	51	124		130.753
3	8752	59	310		373.673	15	6618	59	496		122.019
4	61745	73	1922		334.490	16	6313	59	434		116.740
5	23587	99	744		301.837	17	2580	49	186		111.635
6	16746	67	992		290.408	18	22676	67	1302		91.196
7	4340	43	496		264.286	19	24543	81	1240		85.605
8	10693	53	1240		217.815	20	36731	81	1798		76.350
9	7368	55	558		212.617	21	14621	91	806		70.286
10	710	31	62		197.199	22	32907	97	930		67.400
11	15182	63	930		182.206	23	785	25	186		63.494
12	829	41	62		167.838	24	25953	37	8990		56.841



الشكل (6). نسق البروتينات الذاتية الكلية للعزلة B/A/M14

جدول (10). المؤشرات الكمية للعزلة B/A/M14

Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.	Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.
1	7387	33	2379		352.449	11	24717	77	1159		161.705
2	7131	51	549		344.286	12	4722	47	366		144.288
3	12865	55	976		324.694	13	4753	53	427		135.222
4	13243	57	915		296.939	14	33853	87	1891		112.640
5	2366	27	610		278.980	15	26666	79	1281		89.713
6	2346	25	488		249.592	16	36743	97	1220		79.542
7	6790	53	793		234.898	17	3538	75	305		77.446
8	2867	43	305		217.815	18	1531	35	244		75.754
9	14081	67	1098		198.895	19	10765	43	1952		73.725
10	2565	45	244		178.952						

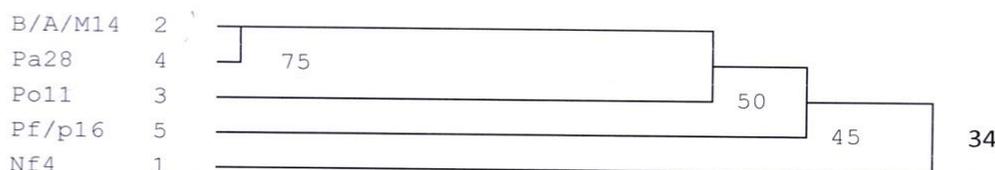


الشكل (7). نسق البروتينات الذاتية الكلية للعزلة Pf/p16

جدول (11). المؤشرات الكمية للعزلة Pf/p16

Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.	Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.
1	27017	85	1524		404.694	16	2825	73	183		180.575
2	20458	83	488		390.000	17	7145	63	427		167.838
3	14461	71	366		373.673	18	43184	91	1525		146.571
4	34442	85	732		363.878	19	7323	53	488		124.173
5	14969	77	366		342.653	20	5565	65	366		119.889
6	6980	75	183		329.592	21	21778	73	1159		102.058
7	17247	71	488		324.694	22	7414	73	427		95.134
8	21226	71	610		305.102	23	38314	93	1891		80.988
9	3904	65	122		293.673	24	18858	39	1647		74.676
10	11300	63	366		282.245	25	38441	85	2196		61.055
11	12930	69	488		272.449	26	32872	101	1464		46.485
12	17428	71	854		259.388	27	20119	91	732		33.752
13	1001	47	61		238.163	28	29955	107	793		30.038
14	19833	59	1159		219.552	29	57346	107	2623		21.303
15	8241	61	549		195.509						

استخدمت مخططات البروتينات الذائبة الكلية في هلام متعدد الاكريلاميد لغرض التصنيف العددي وباستخدام الربط المنفرد للمجاور الاقرب كطريقة للتعقد الشجري وباستخدام معامل التشابه البسيط جاكارد ويوضح الشكل الشجري الهرمي (8) إن العزلات وقعت ضمن (3) عناقيد Phenones ضم العنقود الأول العزلات Po11, Pa28, B/a/m14 والتي تعقدت معاً وبمستوى تشابه  $S_j \geq 50\%$  وتعقد العنقود الثاني والمتمثل بالعزلة Pf/p16 مع العنقود الأول وبمستوى تشابه  $S_j \geq 45\%$  وتعقد العنقود الثالث معهما عند مستوى تشابه  $S_j \geq 34\%$ ، ورغم اختلاف الاجناس والانواع التي تعود لها العزلات فقد سجلت العزلاتان B/A/M14 أعلى نسبة تشابه بلغت  $S_j \geq 75\%$  وأظهرتا عدداً متقارباً من الحزم بلغ 18, 19 حزمة على التوالي. كما اشتركتا باظهار حزمتين متساويتين بوزنهما الجزيئي التقريبي والذي بلغ 73, 79 كيلو دالتون. ومن الجدير بالذكر بان نسبة تشابه هاتان العزلاتان المختلفتان في الجنس اعلى من نسبة تشابه العزلاتان Pa28 و Pf/p16 اللتان تعودان لنفس الجنس والتي بلغت  $S_j \geq 50\%$  وهذا يؤكد مدى القرابة بين الافراد التي تعود لمجموعة البكتريا غير المخمرة وما اظهرته هذه الدراسة. وفي دراسة مشابهة اظهرت عزلات 17 والتي تعود لبكتريا Pa تشابهها فيما بينها وبين عزلات مثيلاتها قيد الدراسة من حيث الاوزان الجزيئية التقريبية لبعض الحزم والتي بلغت 85, 133, 148, 180 كيلو دالتون، وفي دراسة اخرى قام بها ( Durrani et al, 2008 ) اظهرت عزلات Pa عدداً من الحزم تراوحت ما بين 9-11 حزمة وباوزان جزيئية تقريبية تراوحت ما بين 23.4-100.05 كيلو دالتون، واظهرت عزلاتهم التي تعود لبكتريا *Pseudomonas fluorescens* حزماً تراوحت اعدادها بين 7-9 حزم وباوزان جزيئية تقريبية تراوحت ما بين 22-87 كيلو دالتون.



شكل (8). المخطط الشجري الهرمي لخمسة من العزلات المنتخبة والتي تعود لمجموعة البكتريا غير المخمرة والتي تم الحصول عليها بالتحليل العنقودي وباستخدام الربط المنفرد للمجاور الاقرب وباستخدام معامل جاكارد اعتماداً على الترحيل الكهربائي لبروتيناتها الذائبة الكلية

#### المصادر .

- Bauer, A.W.; W.M. Kirby; J.; C. Sheris and M. Turck. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. Am. J. Clin. Pathol. 45: 493-496.
- Bouhaddioi, K.; Ben Sdama, K.; Gharbi, S. & Boudbous, A. (2002) Epidemiology of clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa* strains. Ann. Microbiol., 52, 223-235.

- Clinical and Laboratory Standards Institute performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 17<sup>th</sup>. Informational supplement: CLSI/ NCCLS document m 100-517. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. (2007).
- Durrani, R.; Abubakar, M.; Arshed, Saleha, S.; IrfanUllah&M.; Ali, Q. (2008). Biological characterization and protein profiles of two model bacteria by SDS-PAGE and FT- IR. ARPN Journal of Agricultural and Biological science 3(2&6).
- Eissa, N.; Abou El-Ghiet, E.; Shaheen, A. &Abbass. (2010). Characterization of *Pseudomonas* species isolated from Tilapia *Oreochromis niloticus* in Qaroun and Wadi-El-Rayan Lakes, Egypt. Global Veterinaria 5(2): 116-121.
- Favero, M.S, Carson LA, Bond WW, Petersen NJ. ( 1971) .*Pseudomonas aeruginosa*: growth in distilled water from hospitals. Science. 27;**173**(3999):836–838.
- Ferguson, D.A. chill, O.J. (2007). Phenotypic, molecular and antibiotic resistance profiling of nosocomial *pseudomonas aeruginosa* isolated from two Irish hospitals. Journal of medicine (1).
- Forbes, S. W. (1998) Bailey & Scotts diagnostic microbiology, 10<sup>th</sup> ed. Mosby, Inc. St. Louis, Mo.
- Goldman, E.; Green, L.H. (2009) Practical handbook of microbiology. 2<sup>nd</sup>. ed. Boca Raton: Taylor and Francis Group, LLC.
- Jassem, Z. I (2010). A periodic guide to the antimicrobial therapy and sensitivity profile in Iraq. Central public health laboratories, Ministry of Health, Baghdad, Iraq. Ist. ed.
- Kodama, K.; Kimura, N.;Komagata, K. (1985) Two new species of *Pseudomonas*: *P. oryzihabitans* isolated from rice paddy and clinical specimens and *P. Luteola* isolated from clinical specimen. Int. J. Syst. Bacteriol. 35 (4): 467-474.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assemble of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 68.
- Liu, G.Y. Nizet, Z. (2009).Color me bad: microbial pigments as virulence factors..
- Lubuhn, M.; Achouak, W.; Schloter, M.; Berge, O.;Meier, H.; Barakat, M.; Hartman, A. and Heulin, T. (2000) Taxonomic characterization of *Ochrobactrum* sp. isolated from soil samples and wheat roots, and description of *Ochrobactrum tritici* sp.
- Oberhofer TR, Rowen JW, Cunningham GF.( 1977 ) . Characterization and identification of gram-negative, nonfermentative bacteria. J Clin Microbiol. ;**5**(2):208–220.
- Silva, G.A. Almeida, E.A. (2006). Production of yellow-green fluorescent pigment by *Pseudomonas fluorescent*. Brazilian Archives of Biology and
- Todar's ( 2009). Online Text book of Bacteriology .
- Velasco, J.; Romero, C.; Lopez-Goni, I.; leiu J.; Diaz, R.; andMoriyon, I. (1998). Evaluation of the relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum anthropi*. description of *Ochrobactrum intermedium* sp. nov, a new species with a closer relationship to *Brucella* spp. Int. J. Syst. Bacteriol. 48, 759-768.
- Wauters, G.; Boel, A.; Voorn, G.P; Verhaegen, J.; Meunier, F.; Janssens, M. Verbist, L. (1995). Evaluation of a new identification system, crystal Enteric/ Non Fermenter, For Gram-Negative Bacilli J. Clin. Microbiol. 33(4) 845-849.