دراسة عوامل الضراوة في جرثومة *Acinetobacter baumannii* المعزولة من مصادر سريرية مختلفة في بعقوبة

عباس عبود فرحان الدليمي[1] ، هادي رحمن رشيد الطائي[2] و صفا ماجد محمد الباجلاني[3]

[1،3]جامعة ديالى- كلية التربية للعلوم الصرفة - قسم علوم الحياة
[2]جامعة ديالى - كلية العلوم - قسم علوم الحياة

الخلاصة

تضمنت الدراسة عزل وتشخيص16 عزلة من بكتريا *Acinetobacter baumannii* من 196 عينة جمعت من مصادر سريرية مختلفة في مستشفى بعقوبة التعليمي ومستشفى البتول التعليمي للمدة من 1/10/2014 الى 16/2/2015 ، كانت اعلى نسبة عزل لهذه البكتريا من مسحات الجروح والحروق (10.8% ، 8.3%) على التوالي ، ونسبة عزلات الادرار 6.9% ، اما عينات الدم فكانت تحتوي على اقل نسبة لهذه البكتريا 5% ، وتم تشخيص العزلات بدراسة الصفات المظهرية والمجهرية والاختبارات الكيموحيويةفضلاً عن أستخدام جهاز ViTEK2 للتأكد من التشخيص . أظهرت نتائج التحري عن عوامل الضراوة لبكتريا *Acinetobacter baumannii* ان جميع العزلات لها القابلية على الالتصاق بسطوح الخلايا الطلائية للأنسان وبنسبة 100% ، بينما كانت 13 عزلة لها القابلية على انتاج الغشاء الحيوي وبنسبة 81.2% ، اما بالنسبة لمضخات الدفق فأن سبعة عزلات كانت تمتلك مضخات دفق بكفاءة عالية وبنسبة 43.7% . تم التحري عن حساسية العزلات لأربعة مضادات حيوية عائدة لمجموعة البيتالاكتام ، فأظهرت النتائج ان اعلى نسبة مقاومة كانت لمضاد Cephalexin بنسبة 100% واقل نسبة مقاومة كانت لمضاد Imipenem بنسبة 50% . تم تحديد التركيز المثبط الادنى MIC لمضادي Cefotaxime ، Ceftazidime بطريقة التراكيز المتضاعفة المتسلسلة ، اظهرت النتائج ان قيم MIC لمضاد Cefotaxime تتراوح بين 32-1024 مكغم/مل ، اما مضاد Ceftazidime فأن قيم MIC له تتراوح بين 16-1024مكغم/مل .

الكلمات المفتاحية : بكتريا *Acinetobacter* ، التركيز المثبط الادنى ، عوامل الضراوة ، مضخات الدفق.

دراسة عوامل الضراوة في جرثومة *Acinetobacter baumannii* المعزولة من مصادر سريرية مختلفة في بعقوبة

عباس عبود فرحان الدليمي، هادي رحمن رشيد الطائي و صفا ماجد محمد الباجلاني

Virulence Factors of *Acinetobacter baumannii* isolated from different clinical specimens in Baquba

Abbas Aboud Farhan Al-Dulaimi[1], Hadi R. Rasheed Al-Taai[2] and Safa Majed Mohammed Al-Bajlany[3]

[1 and 3]Diyala University - College of Education Pure Science- Dept. of Biology
[2]Diyala University- College of Science- Dept. of Biology

Received: 12 November 2015 Accepted: 31 May 2016

Abstract

The study included isolation and identification of 16 isolates of *Acinetobacter baumannii* out of 196 samples collected from different clinical specimens in Baquba Teaching Hospital and Al-Batool Teaching Hospital from 1/10/2014 to 16/2/2015. The highest isolation rate of these bacteria from wounds and burns was (10.8%, 8.3%) respectively, and urine was 6.9% , the blood culture were to contain less proportion of these bacteria 5% . The diagnosis of isolates was based on phenotypic , microscopic characteristics and biochemical tests , in addition to use ViTEK2 device to confirm the diagnosis. The results of the investigation of virulence factors of *Acinetobacter baumannii*showed that all isolates have the ability to adhere on surfaces of epithelial cells of humans (100%), while the ability of 13 isolates to produce biofilm was 81.2% , while Seven isolates had possessed efflux pumps with high efficiency (43.7%) .The investigation of the sensitivity test against4 antibiotics from B-lactam group , the results showed the highest percentage was resistant to antibiotic Cephalexin 100% and lowest resistance to antibiotic Imipenem 50% .It was determined the Minimum Inhibitory Concentration MIC for cefotaximeand ceftazidime by method of multiplying serial concentrations , the results inducted that the minimum inhibitory concentration for cefotaxime values ranging between 32-1024 µg/ml , as for the MIC ceftazidime his values ranging between 16-1024 µg/ ml.

Keywords: *Acinetobacter , MIC ,* virulence factors **,** efflux pumps

دراسة عوامل الضراوة في جرثومة *Acinetobacter baumannii* المعزولة من مصادر سريرية مختلفة في بعقوبة

عباس عبود فرحان الدليمي، هادي رحمن رشيد الطائي و صفا ماجد محمد الباجلاني

المقدمة

تمتاز أنواع بكتريا *Acinetobacter* بكونها عصيات مكورة ، سالبة لصبغة كرام ، هوائية ، غير متحركة ، غير مكونة للسبورات وغير مخمرة لسكر اللاكتوز، برزت أهميتها كممرض إنتهازي (Opportunistic pathogen) لمسوؤليتها عن عدد كبير من إصابات المستشفيات (Nosocomial infection) ولاسيما النوع *Acinetobacter baumannii* لما يمتلكهُ من عوامل ضراوة ، فضلاً عن قدرتها على إكتساب المقاومة للمضادات الحيوية ، وكذلك فان قدرتها على البقاء لمدة طويلة في بيئة المستشفيات أدى الى سرعة إنتشارها [1].

تعد بكتريا *A.baumannii* مسؤولة عن العديد من الإصابات المكتسبة في المستشفيات والتي تتضمن ذات الرئة (Pneumonia) ، السحايا (Meningitis) ، تجرثم الدم (Bacterimia) ، إصابات الأنسجة الرخوة (Soft-tissue infections) ، إلتهاب شغاف القلب (Endocarditis) ، إصابات المجرى البولي (Urniary tract infections) و التهاب المجرى التنفسي (Respiratory tract infection) [2] .

تمتلك *A. baumannii* العديد من عوامل الضراوة التي تساعدها في إحداث الإصابة منها المحفظة وتكوينها للغشاء الحيوي والالتصاق بالخلايا الحية والسطوح غير الحية اضافةً الى إنتاجها بعض الانزيمات مثل انزيمات البيتالاكتاميز التي تعمل على مضادات البيتالاكتام مما تجعل المضاد مركب فاقد الفعالية [3].

تنتشر بكتريا *A. baumannii* في بيئة المستشفيات وهنالك عوامل تزيد من خطورة هذه البكتريا منها عمر المريض اذ انها غالباً ما تستوطن المرضى المسنين، طوال فترة الرقود في المستشفى، العلاج الطويل بالمضادات الحيوية واسعة الطيف، ادوية كبح المناعة كالستيرويدات، اضافةً الى الاصابة بالامراض المزمنة كالسكري وامراض القلب والضغط وغيرها ، كما ان لاستخدام الادوات الملوثة في المستشفيات كاجهزة التنفس وادوات الجراحة اثره في زيادة حالات الاصابه بها [4] . تكمن خطورة هذه البكتريا بسرعة انتشارها في البيئة وتحملها للجفاف لفترة قد تصل الى اكثر من شهر فضلاً عن مقاومتها المتعددة للكثير من المضادات الحيوية المستخدمة في العلاج سيما الحديثة منها وان من اهم آليات المقاومة للمضادات الحيوية متمثلة بتغيير بروتينات الغشاء الخارجي Outer membrane proteins(OMPs) ، التحوير في الموقع الهدف Alternation of target site المتمثل بالبروتينات المرتبطة بالبنسلين Penicillin binding protein ، وامتلاكها لمضخات الدفق التي تعمل على طرح المضاد الحيوي خارج الخليةالبكتيرية [5] . لذا هدفت هذه الدراسة الى التحري عن عوامل الضراوة المهمة لبكتريا *A. baumannii* .

المواد وطرائق العمل

عزل البكتريا وتشخيصها Isolation and Identification

جمعت 196 عينة من المرضى الراقدين في مستشفيات بعقوبة التعليمي و البتول التعليمي، خلال الفترة من 2014/10/1 لغاية 2015/2/16 . أخذت العينات تبعاً لنوع الاصابة فقد أستخدمتالمسحات المباشرة في جمع عينات الجروح و الحروق ، في حين جمعت عينات الادرار و الدم من أصابات كل من الجهاز البولي وجهاز الدوران على التوالي ، في قناني و أنابيب اختبار معقمة .

شخصت العزلات البكتيرية مبدئياً اعتماداً على الصفات المظهرية لشكل المستعمرات وقوامها ولونها وحجمها ، فضلاً عن قدرتها على تحليل كريات الدم الحمر على وسط أكار الدم و قدرتها على تخمير سكر اللاكتوز على وسط أكار الماكونكي [4] . أخضعت العزلات الى الفحص المجهري بأستخدام صبغة كرام للتمييز بين شكل الخلايا وايجابيتهاأوسلبيتها لهذه الصبغة [5] . استخدمت كذلك الاختبارات الكيموحيوية لتشخيص العزلات كأختبارالكتاليز ، الاوكسديز ، الاندول ، استهلاك السترات ، اليوريا ، المثيل الاحمر ، فوكس بروسكاور ، الحركة ، النمو على وسط الحديد ثلاثي السكر واختبار قابلية نمو البكتريا في درجات حرارة مختلفة [6] . وتم التأكد من تشخيص البكتريا بأستخدام جهاز VITEK2 المجهز من قبل شركة BioMerieux لتشخيص البكتريا بدرجة عالية من الدقة اذ يتضمن هذا الجهاز 64 اختبارا من الاختبارات الكيموحيوية التي تستعمل في تشخيص البكتريا بحيث تصل درجة دقة التشخيص بهذا الجهاز إلى 99% كذلك يمكن إجراء فحص الحساسية للمضادات الحيوية بهذا الجهاز، و تم اجراء جميع خطوات العمل في مستشفى البتول التعليمي .

أختبار حساسية البكتريا للمضادات الحيوية Antibiotic susceptibility test

أستخدمت طريقة Kerby- Bauer القياسية على وسط أكار مولر هنتونلأختبار حساسية البكتريا للمضادات الحيوية [7] . أذ أختبرت حساسية العزلات قيد الدراسة لأربعة مضادات حيوية تعود لمجموعة مضادات البيتالاكتام التي شملت Cephalexin ، Ampicillin-Sulbactum ، Imipenem ، Ceftazidime ، وكانت تراكيز هذه المضادات (30 ، 20 ، 10 ، 30 µg /قرص) على التوالي ، حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24-18 ساعة وقرأت النتائج بملاحظة مناطق التثبيط المتكونة حول كل قرص أذ اعتبرت البكتريا حساسة او متوسطة او مقاومة للمضادات حسب مقارنة مناطق التثبيط مع المواصفات القياسية الواردة في [7] .

قياس التركيز المثبط الادنى Minimal - Inhibitory Concentration

أستخدمت طريقة التخافيف المضاعفة المتسلسلة Two Fold Dilution MethodSerial لحساب التركيز المثبط الادنى لعدد من المضادات الحياتية[8] . حضرت تراكيز متسلسلة متضاعفة تراوحت بين0.5-1024 مايكروغرام/ مل لمضادات Cefotaxime ، Ceftazidime (Turkey/ Kirklareli)، أحتسب التركيز المثبط الادنى بأنه اقل تركيز يمنع ظهور

النمو البكتيري بعد مدة حضانة 18-24 ساعة بدرجة حرارة 37 م ° ، و تم مقارنة النتائج مع نقطة التوقف Break point حسب ما ورد في [9] .

التحري عن عوامل الضراوة Detection of virulance factors

1 . التحري عن إنتاج الغشاء الحيوي Biofilm

نُقلت مستعمرة مفردة نقية نامية على وسط أكار المكونكي الى أنبوبة أختبار حاوية على 5 مليلتر من محلول الملح الفسلجي وبعد المزج الجيد بأستعمال المازج قُورنت عكورة العالق مع عكورة محلول ثابت العكرة القياسي بعدها لُقح وسط احمرالكونكو وحُضنت الأطباق في درجة حرارة 37 مْ لمدة 28-24 ساعة، تكون النتيجة موجبة عندما تظهر المستعمرات سوداء اللون مع كثافة بلورية جافة ، أما النتيجة السالبة فتبقى المستعمرات وردية اللون [10] .

2 .اختبار الالتصاق بالخلايا الطلائية Test Adhesion With Epithelial Cells

تم الحصول على الخلايا الطلائية من راسب عينات إدرار إناث غير مصابات باخماج المجاري البولية ، إذ غسلت الخلايا بعد ترسيبها بالمحلول الملحي الفسلجي أربع مرات بإعادة النبذ المركزي في كل مرة لمدة خمس دقائق بسرعة 2000-1500 دورة / دقيقة ثم أعيد تعليق الخلايا بالمحلول الفسلجي . أخذ 0.5 مليلتر من مزروع بكتيري بعمر 24 ساعة وأضيف اليه 0.5 مليلتر من عالق الخلايا الطلائية المحضر ،مزج الخليط جيداً ثم حضن بدرجة حرارة 37م° لمدة ساعة واحدة مع التحريك كل عشر دقائق ثم غسلت الخلايا لاربع مرات بالمحلول الملحي الفسلجي مع النبذ المركزي لمدة 5 دقائق بسرعة 2000-1500 دورة بالدقيقة لكل مرة للتخلص من البكتريا غير الملتصقة بعدها أخذت قطرة من العالق النهائي على شريحة زجاجية وتركت لتجف بدرجة حرارة الغرفة ثم ثبتت بحرارة اللهب وصبغت الشريحة بصبغة كرام . لوحظت نتائج الالتصاق تحت المجهر الضوئي بإستخدام العدسة الزيتية إذ تظهر النتيجة الموجبة بالتصاق البكتريا بشكل مفرد أو تجمعات على سطح الخلايا الطلائية. أستخدم الملح الفسلجي مع الخلايا الطلائية من دون عالق بكتيري كفحص سيطرة سالبة [11].

3.الكشف المظهري عن مضخات الدفق Efflex Pump

اجري هذا الاختبار بأستخدام طريقة العجلة الخشبية EtBr-agar Cart Wheel Method حسب ما جاء في [12] حضرت تراكيز مختلفة تتراوح بين 10,20,25,100,200,250 مايكروغرام/مل لصبغة بروميد الاثيديوم(Bioneer Korea /) بأضافة نسب مختلفة من هذه الصبغة الى وسط Trypton Soy Agar TSA المعقم والمبرد الى 45 م° ثم حضر عالق بكتيري من العزلات البكتيرية المراد اجراء الاختبار لها بنقل مستعمرة مفردة بعمر 24 ساعة منماة على وسط نقيع القلب والدماغ الصلببإستعمال المحلول المحلي الفسلجي المعقم وقورنت عكورته مع محلول ثابت العكرة القياسي بعدها سحب 5 مايكروليتر من العالق أعلاه بوساطة ماصة دقيقة كلا على حدة ، ولقحت كقطرة واحدة على وسط TSA المحتوي على صبغة برميدالاثيديوم وتركت الاطباق لفترة في درجة حرارة الغرفة لحين جفاف القطرات قبل قلب الاطباق ، حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة ، فحصت الاطباق بأستعمال مصدر الاشعة فوق البنفسجية

U.V. light لملاحظة شد التألق، فالعزلات البكتيرية التي تعطي تألقاً في التراكيز العالية من الصبغة تمتلك مضخات دفق اعلى فعالية مقارنة بالعزلات التي تتألق فقط بالتراكيز القليلة من الصبغة .

النتائج والمناقشة

العزل والتشخيص Isolation and Identification

تم الحصول على 16 عزلة من بكتريا *A. baumannii* وبنسبة 8.2 % من مجموع 196 عينة جمعت من مصادر سريرية مختلفة (الدم ، الادرار ومسحات الجروح والحروق) أذ ان النسبة الاكبر للعزلات كانت ضمن عينات الجروح 7عزلات بنسبة 10.8 % من المجموع الكلي وتلتها نسبة عينات الحروق اذ بلغت 4عزلات بنسبة 8.3% في حين كانت عينات الادرار 3عزلات بنسبة 6.9% اما النسبة الاقل للعزلات كانت ضمن عينات الدم اذ كانت عزلتان وبنسبة 5% من المجموع الكلي .

تم تشخيص العزلات البكتيرية بالاعتماد على الصفات المظهرية والزرعية والصفات المجهرية للخلايا البكتيرية والاختبارات الكيموحيوية كما مبين في جدول (1) ، اذ اظهرت هذه العزلات عند تنميتها على وسط أكار الماكونكي بكونها مستعمرات صغيرة ، دائرية منتظمة ، ملساء ، شاحبة و غير مخمرة لسكر اللاكتوز في حين ظهرت على وسط اكار الدم بشكل مستعمرات رمادية اللون غير محللة للدم لكونها غير منتجة لانزيمالهيمولايسن . اظهرت نتائج الفحص المجهري ان خلايا البكتريا المعزولة صغيرة ذات شكل عصوي مكور ، تنتظم بشكل ازواج او قد تكون مفردة ، سالبة لصبغة كرام ، كذلك اظهرت الاختبارات الكيموحيوية لبكتريا *A. baumannii* بأنها سالبة لفحص الاوكسيديز ، موجبة لفحص الكتاليز ، موجبة لفحص اليوريز ، كذلك تم اجراء فحص ال IMVC وكانت النتيجة سالبة لفحص الاندول ، سالبة لفحص احمر المثيل ، سالبة لفحص فوكاسبروسكاور وموجبة لاستهلاك السترات مصدراً وحيداً للكاربون ، وبينت نتائج النمو على وسط TSI عدم قدرتها على استهلاك السكريات المتواجدة في الوسط ، لذلك لجأت الى استهلاك الببتونمحررة الامونيا مما أدى الى رفع الرقم الهيدروجيني الى القاعدي وتغيير لون سطح الوسط المائل الى الاحمر من دون تغير قعر الانبوبة ، فضلاً عن ذلك عدم إنتاجها غاز كبريتيد الهيدروجين (H_2S) ، عدم قدرتها على الحركة ، وامكانيتها من النمو في درجات حرارة 37 و 44 م°، إذ ان قابيلة النمو بدرجة حرارة 44م° تعد صفة فسلجية تميز النوع *A. baumannii* عن بقية الانواع .

جدول (1) الاختبارات الكيموحيوية والمجهرية والزرعية لبكتريا *A. baumannii*

الاختبار	النتيجة
Catalase	+
Oxidase	-
Urease	+
Simmon citrate	+
Indol production	-
Methyl red	-
Voges_ proskaure	-
TSI	Alkalin/ non change
H_2S Production	-
Lactose fermentation	-
Motility	-
Gram Stain	Gram's negative
° Growth in 44 C	+
Haemolysin Production	-

تم تشخيص العزلات بأستخدام جهاز VITEK 2لتأكيد التشخيص ، وكانت النتائج مطابقة للاختبارات الكيموحيوية التي اجريت في المختبر .

اختبار حساسية البكتريا للمضادات الحيوية Antibiotic susceptibility test

أظهرت نتائج الدراسة الحالية تبايناً واضحاً في مدى استجابة العزلات قيد الدراسة للمضادات المستعملة ، أذ اظهرت النتائج المبينة في جدول (2) ان جميع العزلات مقاومة لمضاد Cephalexin وبنسبة 100% وهو من مجموعة سيفالوسبورينات الجيل الاول ، وجاءت هذة النتيجة متوافقة مع ما توصل اليه [13] اذ بلغت نسبة المقاومة لهذا المضاد 100% ، بينما اظهرت العزلات قيد الدراسة بأنها حساسةلمضاد Ampicillin-Sulbactum بنسبة 100% ، تتفق هذه النتيجة مع دراسة اجريت في الصين من قبل الباحث Yu اذ بلغت نسبة العزلات المقاومة لهذا المضاد 6.2% [14] ، لكن لم تتفق هذه النتيجة مع ما توصل اليه الباحث Mirnejad اذ كانت نسبة العزلات المقاومة لهذا المضاد 49% [15] ، كذلك بينت النتائج ان نسبة عزلات بكتريا *A. baumannii* المقاومة لمضاد Ceftazidime 68.7 % ، تتفق هذه النتيجة مع ما توصل اليه [16] اذ بلغت نسبة العزلات المقاومة لهذا المضاد 66.6% ، ولا تتفق هذه النسبة مع ما توصلت اليه [17] ، اما مضاد Imipenem فقد اظهرت النتائج بأن نسبة مقاومة عزلات بكتريا *A. baumannii* لهذا المضاد كانت 50% ، وهذه النتيجة تتفق مع ما توصل اليه [18] بأن نسبة العزلات المقاومة لمضاد Imipenem 49% ، اوضحت الدراسة الحالية ان مقاومة بكتريا *A. baumannii* لمضادات البيتالاكتام تعزى لعدة اسباب منها تحلل المضاد الحيوي بسبب انتاج انزيمات البيتالاكتاميز التي تعمل على ابطال فعالية مضادات البيتالاكتام عن طريق كسر حلقة البيتالاكتام في

مجموعة البنسليناتوالسيفالوسبورينات ، تقليل نفاذية الغشاء الخلوي للمضادات وتغير بروتينات هذا الغشاء مما يؤدي الى صعوبة مرور المضاد ووصوله الى موقع عمله أذ يحتوي الغشاء الخارجي على قنوات بروتينية تدعى البورين التي تعمل على منع دخول المضادات الى داخل الخلية البكتيرية ، تقليل الالفة الى انزيم Penicillin-Binding Proteins ، وامتلاكها لمضخات الدفق التي تعمل على قذف المضاد خارج الخلية كذلك فأن الاستخدام العشوائي لهذه المضادات ادى الى ظهور سلالات بكتيرية مقاومة لها [19] .

جدول (2) النسب المئوية لحساسية العزلات قيد الدراسة للمضادات الحيوية

	عددالعزلات (%)		المضادات الحيوية
Sensitive	**Intermediate**	**Resistant**	**Antibiotic**
(0) 0	**(0) 0**	**(100) 16**	**Cephalexin**
(100) 16	**(0) 0**	**(0) 0**	**Ampicillin-Sulbactum**
(31.2) 5	**(0) 0**	**(68.7) 11**	**Ceftazidime**
(50) 8	**(0) 0**	**(50) 8**	**Imipenem**

قياس التركيز المثبط الادنى Minimal - Inhibitory Concentration

اخضعت جميع العزلات قيد الدراسة لأختبار تحديد التركيز المثبط الادنى لمضادين Cefotaxime ، Ceftazidime حددت قيم MIC بطريقة التراكيز المتسلسلة المتضاعفة في وسط اكار مولر هنتون ، تشير النتائج الى ان قيم التراكيز المثبطة الدنيا لمضاد Cefotaxime تتراوح بين 1024-32 ، تتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه [20] اذ اثبت ان نسبة 91.2% من عزلاته يكون MIC لها ≤32 ، ولكن تختلف هذه النتائج مع دراسة اجريت في مصر اذ كانت قيم MIC لهذا المضاد ≥256 وبنسبة 100% [21] . اما بالنسبة لمضاد Ceftazidime فأن قيم MIC له تتراوح بين 1024-16 ، تتفق هذه الدراسة مع ما توصل اليه [22] اذ اوضح ان قيم MIC لهذا المضاد تكون بتراكيز اكبر من 16 ، لكن لاتتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه [23] اذ اوضح ان قيم MIC لهذا المضاد تتراوح بين 64-0.5 .

يعزى سبب المقاومة لمضادات السيفالوسبورينات الى الاستعمال المستمر لهذا النوع من المضادات والذي ينتج عنه تطور صفة المقاومة وخاصة عن طريق تغيير الموقع الهدف أو عن طريق أنظمة الدفق وكذلك انتاج انزيمات البيتالاكتاميز، وكل هذه الميكانيكيات يشفر لها كروموسوميا [24] .

عوامل الضراوة Virulance factors

- **الغشاء الحيوي Biofilm**

اختبرت جميع عزلات بكتريا *A. baumannii* للتحري عن قابليتها على انتاج الغشاء الحيوي واظهرت النتائج ان 13عزلة فقط وبنسبة 81.2% لها القدرة على انتاج الغشاء الحيوي ، جدول (3) ، وكانت هذه النتيجة متوافقة مع ما توصل اليه [25] اذ بلغت نسبة انتاج بكتريا *A. baumannii* للغشاء الحيوي 80% ، ولكن لم تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل اليه [26] اذ كانت نسبة العزلات المنتجة للغشاء الحيوي 17.6% بواقع 3عزلات ، وان سبب اختلاف النسب بين دراسة واخرى قد يعود الى عدة عوامل بيئية تؤثر على تكوين الغشاء الحيوي وتعطي نتائج متغايرة منها درجة الحرارة ، الرطوبة ، الاوكسجين وغيرها [27].

ان البكتريا المنتجة للغشاء الحيوي تكون مسؤولة عن العديد من الاصابات والامراض التي يكون من الصعب معالجتها بسبب تقييد وصعوبة اختراق المضاد الحيوي لهذا الغشاء وكذلك امتلاك البكتريا صفة المقاومة للعديد من المضادات الحيوية ، ومقاومة الاستساغة Opsonisation والبلعمة Phagocytosis والظروف البيئية المختلفة [28] .

- **الالتصاق Adhesion**

استخدمت لغرض اجراء هذا الاختبار الخلايا الطلائية المعزولة بالترسيب من الادرار الوسطي لنساء غير مصابات بألتهاب المجاري البولية ، اذ اظهرت نتائج الدراسة الحالية ان جميع عزلات بكتريا *A. baumannii* لها القابيلة على الالتصاق بسطوح الخلايا الطلائية للانسان وبنسبة 100% جدول (3) ، جاءت هذه النتائج متوافقة مع ما توصل اليه [29] اذ اوضح ان بكتريا *A. baumannii* لهاالقابلية على الالتصاق بنسبة 100% ، وهذا مايفسر قدرة هذه البكتريا على استعمار خلايا الانسان واحداث الاصابة اذ تعد عملية التصاق البكتريا على سطوح الخلايا الطلائية مرحلة اولية واساسية لحدوث الاصابة ، كذلك فأن عملية الالتصاق تكون مقترنة بوجود الخمل Pilli في الخلايا البكتيرية ، اذ تلتصق هذه الخملات بطبقة Glycolipid الموجودة في الخلايا الطلائية وقد يؤدي هذا الى التهابات حويض الكلية [30] .

- **مضخات الدفق Efflex Pump**

اختبرت 16 عزلة تعود لبكتريا *A. baumannii*للكشف عن وجود مضخات الدفق بأعتماد طريقة العجلة الخشبية Ethidium Bromide-Agar Cartweel Method (EtBrCW) واعتماد صبغة بروميد الاثيديوم كمؤشر للكشف عن مضخات الدفق ، اظهرت النتائج ان 7عزلات وبنسبة 43.7% من البكتريا قيد الدراسة تمتلك مضخات دفق بكفاءة عالية ، بينما كانت 4عزلات بنسبة 25% تمتلك مضخات دفق متوسطة الانتاجية ، في حين ان 5 من العزلات بنسبة 31.2% اعطت نتيجة سالبة لهذا الاختبار اي انها لاتمتلك مضخات دفق ، جدول (3) ، تقاربت هذه النتائج مع ما توصلت اليه [31] اذ بلغت نسبة عزلاتها المنتجة لمضخات الدفق بكفاءة عالية 52.9% بينما كانت نسبة العزلات التي تمتلك مضخات دفق متوسطة الانتاجية 8.8% ، اما نسبة العزلات غير المنتجة لمضخات الدفق والتي اعطت نتيجة سالبة هي 38.2% . اكدت النتائج ان معظم العزلات التي اظهرت انها تمتلك مضخة دفق بالكشف المظهري كانت لها القابلية على

تكوين الغشاء الحيوي ولها قيم MIC عالية بالنسبة لمضادات Ceftazidim ، Cefotaxim ، مقارنة مع العزلات التي كانت متوسطة وسالبة الانتاجية لمضخات الدفق .

جدول (3) : قابلية عزلات بكتريا *A. baumannii* على انتاج بعض عوامل الضراوة

رقم العزلة	انتاج الغشاءالحيوي	الالتصاق	*مضخات الدفق
Aw 1	-	+	-
Aw 2	+	+	+
Aw 3	+	+	++
Ab 4	+	+	++
Ab 5	+	+	++
Aw 6	+	+	++
Ab 7	+	+	++
Ab 8	+	+	++
AB 9	+	+	+
Au 10	-	+	-
Aw 11	+	+	-
Aw 12	+	+	-
AB 13	+	+	+
Au 14	+	+	+
Aw 15	+	+	++
Au 16	_	+	-

+ : تدل على امتلاك البكتريا عامل ضراوة / - : عدم امتلاك البكتريا عامل ضراوة

Aw: تشير الى العزلات المعزولة من الجروح/Ab: تشير الى العزلات المعزولة من الحروق

AB: تشير الى العزلات المعزولة من الدم / Au: تشير الى العزلات المعزولة من الادرار

*مضخات الدفق / + : امتلاك البكتريا مضخات دفق متوسطة الانتاجية .

++ : امتلاك البكتريا مضخات دفق عالية الانتاجية .

المصادر

1. **Poirel,** L. ; Bonnin, R. A. and Nordmann, P. (2011) . Genetic basis of antibiotic resistance in pathogenic *Acinetobacter* species. IUBMB Life . 63(12): 1061–1067.
2. **Safari,** M. ; Saidijam, M. ; Bahador, A. ; Jafari, R. and Alikhani, M. Y. (2013) . High prevalence of multidrug resistance and metallo-betalactamase (MbetaL) producing *Acinetobacter baumannii* isolated from patients in ICU Wards, Hamadan, Iran . J. Res. Health Sci. 13: 162–167 .
3. **Dijkshoorn,** L.; Brouwer, C.P.J.; Boggards, S.J.; Nemec, A .;Broek,P. J.V.and Nibbering, P.H.(2004) .The Synthetic N-Terminal Peptide of Human Lactoferrin, hLF(1-11), Is Highly Effective against Experimental Infection Caused by Multidrug-Resistant Acinetobacter baumannii . Antimicrobial Agents And Chemotherapy . 48 (12) : 4919–4921 .
4. **Gerischer,** U . (2008) .Acinetobacter Molecular Biology 1st ed .Caister Academic Press , Germany. 1-348 .
5. **Guilfoile**, P. G. ; Alcamo, E. and Heymann, D. (2007) . Antibiotic – Resistance bacteria. Chelsea House Publishers . 53: 62-72 .
6. **Holt**, J. G. ; Krieg, N. R. ; Sneath, P. H. A. ; Staley, J. A. and Williams, S. T. (1994) . Bergy's Manual Of Derminative Bacteriology . 9th ed.Baltimore , Williams and Wilkins . 625-703.
7. **Finegold,** S. M. and Martin, W. J. (1982) . Diagnostic Microbiology. 6th ed. Mosby Company. London .
8. **Retty,** A. F. ; Danil, F. S. and Aice, S. W. (2007) . Bailey and Scott's of Diagnostic Microbiology. 12th ed. Press, Houston, Texas .
9. **CLSI** (2012a) . Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition M07-A9 . CLSI . Clinical and Laboratory Standards Institute , Wayne, PA. USA . 32(2): 1-88 .
10. **Stocks**, E. J. and Ridgway, G. (1987) . Handling clinical speciment for microbiology studies ; 5th ed. Churchill living stone , Edinburgh . 173-201.

11. **CLSI** (2012b) . Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational SupplementM100-S22 . Clinical and Laboratory Standards Institute **,** Wayne, PA. USA . 23(3): 1-188 .
12. **Mathur,** T. ; Singhal S. ; Khan S. ; Upadhyay D.J. ; Fatma T. and A. Rattan. (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.
13. **Iwahi**, T. ; Abs, R. ; Nako , M. and Imado, A. (1983). Role of type-1 fimbriae in the pathogensis of ascending UTI by *E.coli* in mice . Infec. Immune. 39: 1307-1315 .
14. **Martins**, M. ; Viveiros, M. ; Couto, I. ; Costa, S. S. ; Pacheco, T. ; Fanning, S. ; Pagès, J. M. and Amaral, L. (2011) . Identification of efflux pump-mediated multidrug-resistant bacteria by the Ethidium Bromide-agar Cartwheel Method . In Vivo . 25: 171–178 .
15. **Li** , D. M. ; Sun, T. T. (2014) . Facial ulcerations due to *Acinetobacter baumannii*: Vessel thrombosis with bacterial mycelia . Elsevier . 1(4): 89-91 .
16. **Yu,** Y. ; Yang, Q. ; Xu, X. ; Kong, H. ; Xu, G. and Zhong, B. (2004) . Typing and characterization of carbapenemresistant*Acinetobacter calcoaceticus–baumannii* complex in a Chinese hospital . Journal of Medical Microbiology . 53: 653–656 .
17. **Mirnejad,** R. and Vafaei, S. (2013) . Antibiotic resistance patterns and the prevalence of ESBLs among strains of *Acinetobacter baumannii* isolated from clinical specimens . Journal of Genes Microbes and Immunity . 2013: 1-8 .
18. **Badave,** G. K. and Kulkarni, D. (2015) . Biofilm Producing Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii*: An Emerging Challenge . Journal of Clinical and Diagnostic Research . 9(1): 8-10 .
19. **AL-Masoudi**, K. K. ; AL-Saffar, J. M. and Kendla, N. J. (2015) . Molecular Characteristics of Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolated from Baghdad Hospitals . Iraqi Journal of Science . 65(2): 1394-1399 .

20. **Maslow,** J .N. ; Glaze T. ; Adams, P. and Lataillade, M.(2005). Concurrent outbreak of multidrug-resistant and susceptible subclones of *Acinetobacter baumannii*affecting different wards of a single hospital .Infect.Control. Hosp.Epidemiol. 26**:** 69–75 .

21. **Mussi**, M. A.; Limansky, A.S.and Viale, A. M. **(**2005) . Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii* : natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of beta-barrel outer membrane proteins .Antimicrob.Agents Chemother. 49**:** 1432–1440 .

.20) . عباس شاكر جواد ، **المحنة**2006 دراسة جزيئية ووراثية لعوامل الضراوة لبكتريا (*Acinetobacter* المعزولة من خمجات مرضية مختلفة . رسالة ماجستير ، كلية العلوم،الجامعة المستنصرية .

21. Al-Agamy, M. H. ; Khalaf, N. G. ; Tawfick, M. M. ; Shibl, A. M. and El Kholy, A. (2014) . Molecular characterization of carbapenem-insensitive *Acinetobacter baumannii* in Egypt . International Journal of Infectious Diseases . 22: 49-54 .

22. Husni, R. H. ; Lawrence, S. G. ; Alejandro, C. A. ; Geraldine S. H. ; Cynthia F. R. N. ; James, K. S. and Steven, M. G. (1999) . Risk facters for an outbreak of multi-drugs resistant *Acinetibacter* nosocomial pneumonia among intubated patients . Chest. 115: 1378-1382 .

23. Swenson, J. M. ; Killgore, G. E. and Tenover, F. C. (2004) . Antimicrobial Susceptibility Testing of *Acinetobacter spp.* by NCCLS Broth Microdilution and Disk Diffusion Methods . Journal Of Clinical Microbiology . 42(11): 5102–5108 .

24. Clark, N.M.; Patterson, J.and Lynch, J. P.(2003) . Antimicrobial resistance among gram-negative organisms in the intensive care unit .Curr.Opin.Crit.Care . 9: 413 – 423.

25. Al-saad, N. F. ; AL-Saeed, M. S. and Bnyan, I. A. (2012) . Biofilm Formation by Bacterial Isolates from Burn Infected Patients . Medical Journal of Babylon . 9(3): 517-525 .

26. Al-Ajeeli, E. Q. K. (2013) . Molecular Study of Extended Spectrum B-Lactamases and Metallo-B Lactamases Produced by Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* And *Pseudomonas aeruginosa* . Thesis of Doctorate . College of Science . University of Kufa .

27. Götz, F. (2002) . *Staphylococcus* and biofilms . Mol. Microbiol. 43(6): 1367-1378 .

28. Hassan, A. ; Usman, J. ; Kaleem, F. ; Omair, M. ; Khalid, A. and Iqbal, M. (2011) . Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates **.**The Brazilian Journal of Infectious Diseases . 15(4): 305-311 .

29.) **المشهداني** ، إيناس إبراهيم جاسم . (2010 . دراسة فعالية البكتريوسين المنتج من قبل بكتريا *Lactobacillus plantarum* في عوامل الضراوة لبكتريا *Acinetobacter baumannii* . رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية .

30. Brook, G.F. ; Butel, J.S. and Mores, S.A. (2004) . Medical Microbiology .Jawetz , Melnick and adelberg's.23th ed . Appleton and Lange , USA. 223-261 .

31.) **عبدالله**، أحلام خليفة . (2014 . مضخات الدفق (Efflux pump) فيبكتريا *Staphylococcus aureus* المقاومة للمثيسيلين . رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية .