



التوصيف المظهري والجزئي لبعض عوامل الضراوة  
في بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من مرضى إصابات  
الأذن في محافظة كربلاء المقدسة

رسالة مقدمة إلى

مجلس كلية العلوم – جامعة كربلاء

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من قبل

زينه حيدر عباس

بكالوريوس علوم حياة (٢٠٢٠) / جامعة كربلاء

بإشراف

م.د. عزيزياسرحسن العذاري

جمادى الآخرة - ١٤٤٦ هـ

كانون الأول - ٢٠٢٤ م

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿قَالُوا سُبْحَانَكَ لَا عِلْمَ لَنَا

إِلَّا مَا عَلَّمْتَنَا إِنَّكَ أَنْتَ

الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ﴾

صَدَقَ اللَّهُ الْعَلِيُّ الْعَظِيمُ

سورة البقرة: الآية ٣٢

## إقرار المشرف

اشهد بأن إعداد هذه الرسالة قد جرى تحت إشرافي في جامعة كربلاء بوصفها جزءاً من متطلبات نيل شهادة ماجستير في علوم الحياة .

التوقيع : 

الاسم : د. عزيز ياسر حسن العذاري

المرتبة العلمية : مدرس

التاريخ : 2024 / 10 / 22

## توصية رئيس قسم علوم الحياة

بناء على التوصيات أعلاه أحيل هذه الدراسة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها .

التوقيع : 

الاسم : د. مؤيد نعيم كريم

المرتبة العلمية : مدرس

العنوان : رئيس قسم علوم الحياة

التاريخ : 2024 / 10 / 22

## إقرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة الموقعين إناه، نشهد باننا قد اطلعنا على هذه الرسالة الموسومة بعنوان (التوصيف المظهري والجزيني لبعض عوامل الضراوة في بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من مرضى إصابات الاذن في محافظة كربلاء المقدسة) المقدمة من قبل الطالبة (زينه حيدر عباس) كجزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة وبعد اجراء المناقشة العلنية وجد أنها مستوفية لمتطلبات الشهادة وعلية نوصي بقبول الرسالة بتقدير (امتياز)

### عضو اللجنة

التوقيع: 

الاسم: د. لقاء يحيى محسن

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: جامعة بابل / كلية العلوم

التاريخ: 2024/12/31

### عضو ومشرفا

التوقيع: 

الاسم: د. عزيز ياسر حسن

المرتبة العلمية: مدرس

العنوان: جامعة كربلاء / كلية العلوم

التاريخ: 2024/12/31

### رئيس لجنة المناقشة

التوقيع: 

الاسم: د. علي عبد الكاظم جاسم

المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: جامعة كربلاء / كلية العلوم

التاريخ: 2024/12/31

### عضو اللجنة

التوقيع: 

الاسم: د. ليندا حميد توكي

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: جامعة كربلاء / كلية العلوم  
الطبية التطبيقية

التاريخ: 2024/12/31

### مصادقة عمادة كلية العلوم / جامعة كربلاء

أصادق على ما جاء في قرار اللجنة أعلاه

التوقيع: 

الاسم: د. حسن جميل جواد الفتلاوي

المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: عميد كلية العلوم / جامعة كربلاء

التاريخ: / /

## الإهداء

إلى من رسم حلق العيون بحائه... وأنوار سنا السماء بسينه...  
وشع اليسر ببيائه... وأنبلج نورُ الله بنونه... فكان قديم الإحسان بحُسنيه

إلى نور عيني وفخري إلى من وفر لي سبل السعادة والنجاح..... والدي العزيز  
إلى من ابصرت بها طريق حياتي واعتزازي بذاتي إلى القلب الحنون..... والدتي الغالية  
إلى مصدر الأمان الذي استمد منه قوتي والداعم الأول لتحقيق طموحي..... أخي

أهدي ثمرة جهدي

زينه

## الشكرُ والتقدير

بعد الحمدُ لله والشكرِ له والثناء على ما أفاضَ به عليَّ من جزيلِ النِعَم، فالشكرُ للمخلوقِ بعد الخالقِ بعضُ من ردِّ الجميلِ؛ لذلك أزجي فائقَ تقديري واحترامي وشُكري إلى الدكتور (عزيز ياسر حسن العذاري) الذي أشرف على هذه الرسالة، ولم يَدَّخِرْ جُهْدًا، ولم يبخلْ بنصيحةٍ أو معلومةٍ تُساعد في إنجاز الرسالة، فكان خيرَ مَعينٍ لي استقي منه جنان العلمِ وألبَّ المعرفة، فله عميقُ الشكر والامتنان.

كما أتقدّم بالشكر والامتنان إلى رئاسة جامعة كربلاء وعمادة كلية العلوم ورئاسة قسم علوم الحياة وذلك لأتاحة الفرصة لي لاكمال دراستي.

ويطيبُ لي أن أتقدّم بالشكر والتقدير للأساتيد الكرام في كلية العلوم- قسم علوم الحياة، الذين لم يبخلوا بجهد أو وقت في سبيل تعليمنا ونجاحنا خلال السنة التحضيرية.

وأتقدم بخالص الشكر والتقدير إلى جميع الكادر الصحي في شعبة المختبرات، وحدة الأحياء المجهرية في مدينة الإمام الحسين الطبية، وكذلك إلى استشارية الأنف والأذن والحنجرة على مساعدتهم القيمة في جمع العينات السريرية، ولا بُدَّ أن أتقدم بالشكر والعرفان إلى الدكتور عدنان هاشم والدكتور عادل المسعودي والدكتور عمار عليوي وإلى الست اميرة محمد جبر أدعو الله أن يجزيهم بالخير في الدنيا والآخرة على كُلِّ ما قدموه لهذا العمل العلمي.

وأخيرًا أقدمُ وافر شكري وامتناني مشفوعًا بأصدق المشاعر وأرقِّها وأطهرها إلى عائلتي وزميلاتي اللاتي رافقني رحلتي الدراسية بصعوباتها وعذوبتها وأمانها..

الباحثة

الخلاصة

Summary

## الخلاصة

تُعدُّ إصابات الأذن مشكلة سريرية شائعة في جميع أنحاء العالم إذ تفضي أحياناً إلى فقدان السمع في الأشخاص المعرضين لهذه الإصابات. تمَّ جمع ١١٠ مسحة من المرضى المصابين بالتهابات الأذن في استشارية الأنف والأذن والحنجرة في مدينة الإمام الحسين الطبية والعيادات الخاصة في مناطق مختلفة من محافظة كربلاء المقدسة وتراوحت أعمارهم بين (١-٧٥) سنة للفترة من آب ٢٠٢٣ إلى تشرين الأول ٢٠٢٣. بعد زراعة العينات، وقد كشفت نتائج زرع العينات أن 97 (88.18%) عزلة أظهرت نموًا ميكروبيًا، منها ٨٥ (٨٧,٦٣%) عزلة أظهرت نموًا بكتيريًا و ١٢ (١٢,٣٧%) عزلة أظهرت نموًا فطريًا، إذ اقتصرت الأخيرة على عزلتين (١٦,٦٧%) من عفن *Aspergillus spp.* و ١٠ (٨٣,٣٣%) عزلات تعود لخميرة *Candida spp.*

من أجمالي العزلات البكتيرية، كانت البكتيريا السالبة لصبغة كرام أكثر شيوعًا من البكتيريا الموجبة لهذه الصبغة إذ بلغت ٦٧ (٧٨,٨٢%) عزلة تضمنت ٣٥ (٤١,١٨%) عزلة تعود لجنس *Pseudomonas spp.*، في حين شملت الأجناس الأخرى والتابعة إلى العزلات السالبة لصبغة كرام بكتيريا *Burkholderia spp.* و *Proteus spp.*، *Klebsiella spp.*، *Escherichia spp.* وبواقع ١١ (12.94%)، ١٠ (١١,٧٦%)، 7 (8.24%) و ٢ (٢,٣٥%) عزلة على التوالي، وكانت أقل نسبة عائدة لبكتيريا *Bordetella spp.* و *Stenotrophomonas spp.* بواقع عزلة واحدة (1.18%) لكل جنس بكتيري، أما العزلات البكتيرية الموجبة لصبغة كرام فقد تضمنت ١٨ (٢١,١٨%) عزلة تعود لجنس *Staphylococcus spp.*

تم تشخيص ثلاثة أنواع بكتيرية في هذه الدراسة باستخدام نظام Vitek 2 وهي بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa*، *Pseudomonas putida* و *Pseudomonas fluorescens* وبواقع ٣٠ (٣٥,٢٩%)، ٣ (٣,٥٣%) و ٢ (٢,٣٥%) عزلة على التوالي. وأكدت نتائج التشخيص الجزيئي بتفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) باستخدام جين الرنا الرايبوسومي *16s rRNA* أن جميع عزلات *P. aeruginosa* تحمل هذا الجين الثابت وراثيًا. توصلت هذه الدراسة إلى أن بكتيريا *P. aeruginosa* هي النوع الأكثر شيوعًا بين الأحياء المجهرية المسببة لإصابات الأذن في العينات قيد الدراسة.

استخدم نظام Vitek 2 compact system لتحديد حساسية عزلات بكتيريا *P.aeruginosa* تجاه ١٢ مضاد حيوي، من أجمالي ٣٠ عزلة من بكتيريا *P. aeruginosa*، كانت ٩٦,٦٧% من العزلات مقاومة لمضاد Ticarcillin /clavulanic acid و Ticarcillin. بالإضافة إلى ذلك، كانت



٩٣,٣٣% من العزلات مقاومة لكل من Cefepime و Ceftazidime،Piperacillin . وكذلك أظهرت النتائج ٩٠% من العزلات مقاومة تجاه Imipenem و Gentamicin . وفي الوقت ذاته كان ٨٦,٦٧% من العزلات البكتيرية كانت مقاومة لكل من المضادين Ciprofloxacin ،Tobramycin و Meropenem. علاوة على ذلك، أظهرت البكتيريا مقاومة للمضادات Amikacin و Colistin بنسبة (80 و ٢٠) % على التوالي.

بعد التحري عن بعض عوامل الضراوة لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* ، أظهرت النتائج أن ٢٤ (٨٠%) عزلة أنتجت البايوسيانين، ٢٣ (٧٦,٦٧%) عزلة منتجة للبروتينيز و ٢٠ (٦٦,٦٧%) عزلة ذات إنتاج للهيموليسين، كما كشفت الدراسة أن كلَّ عزلة من عزلات *P. aeruginosa* التي تمَّ اختبارها لديها القدرة على إنتاج الأغشية الحيوية باستخدام الطريقتين النوعية والكمية ، في الكشف النوعي، تم تحديد ٦ (٢٠%) عزلات كانت قوية الإنتاج ،وأخرى متوسطة بواقع ٨ (26.67%) عزلات و ١٦ (53.33%) عزلة ضعيفة الإنتاج ، وبينت نتائج الاختبار الكمي أن جميع عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* قادرة على إنتاج الأغشية الحيوية. من بين هذه العزلات، كانت ١٢ (٤٠%) عزلة ذات إنتاج قوي للأغشية الحيوية وأخرى متوسطة الإنتاج بواقع ١٥ (٥٠%) عزلة، بينما كانت 3 (10%) عزلات ضعيفة الإنتاج بالإضافة إلى الفحص المظهري لإنتاج الأغشية الحيوية، أظهرت الكشوفات الجزيئية باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل أن ٧ (٢٣,٣٣%) و ١٥ (٥٠%) عزلة كانت تحمل جينات تكوين الأغشية الحيوية *psIA* و *psID* على التوالي.

من ناحية أخرى، أظهر الكشف الجزيئي أن جميع عزلات هذه البكتيريا الثلاثين (١٠٠%) تحتوي على كلَّ من جين *ndvB* و *tssC1* التي تشارك في مقاومة المضادات الحيوية الخاصة بالأغشية الحيوية. بسبب ارتباط تطوير الأغشية الحيوية بنشاط مضخات التدفق، أجري الكشف عن مضخات التدفق في ٣٠ عزلة تعود لبكتيريا *P. aeruginosa* باستخدام طريقة العجلة-اكار بروميد الإيثيديوم Ethidium Bromide-Agar Cartwheel. كشفت النتائج أن ٢٣ (٧٦.67%) عزلة بكتيرية كانت إيجابية للكشف المظهري. تمَّ الاعتماد في ذلك على أدنى تركيز لم تظهر فيه العزلات تألق تحت مصدر الأشعة فوق البنفسجية (UV)، كما اكدت هذه النتائج على المستوى الجزيئي باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل، اذ تبين ان ١٧ (٥٦,٦٧%) عزلة من بكتيريا *P. aeruginosa* تحمل جين *mexB*، الذي يشفر لأحد البروتينات الثلاثة المكونة لنظام الضخ MexAB-OprM، الذي ينتمي إلى عائلة تقسيم العقيدات المقاومة.

تشير نتائج النمذجة الجزيئية إلى أن التركيب المتوقع لانزيم الأدينيلات كائيز (Adk) في بكتيريا *P.aeruginosa* مرتب في ثلاثة مناطق فرعية وظيفية ، هي منطقة اللب ( core subdomain)،منطقة ارتباط الأدينوسين أحادي الفوسفات (AMP-binding subdomain(AMP<sub>bd</sub>)) ومنطقة ارتباط الأدينوسين ثلاثي الفوسفات ( ATP-binding subdomain(LID) ). تم تقييم وثيقة نموذج Adk وتبين أنه يمتلك درجة ثقة عالية بواسطة برنامج .MolProbity version 4.4

## قائمة المحتويات

| الصفحة                                | المحتويات  | التسلسل |
|---------------------------------------|--|---------|
| <b>الفصل الأول - المقدمة</b>          |  |         |
| 1                                     | المقدمة  |         |
| <b>الفصل الثاني - استعراض المراجع</b> |  |         |
| 4                                     | الأذن (The Ear)  | ١-٢     |
| 4                                     | أجزاء الأذن (Ear Parts)  | ٢-٢     |
| 5                                     | الحواجز المناعية في الأذن (Immunological Barriers Of The Ear)                  | ٣-٢     |
| 6                                     | الأنواع الرئيسية لالتهابات الأذن (Main Types of Ear Infections)                | ٤-٢     |
| 6                                     | التهاب الأذن الخارجية (Otitis Externa, OE)                                     | ١-٤-2   |
| 6                                     | التهاب الأذن الوسطى (Otitis Media , OM)  | ٢-٤-٢   |
| 7                                     | التهاب الأذن الوسطى الحاد (Acute Otitis Media, AOM)                            | ١-٢-٤-٢ |
| 7                                     | التهاب الأذن الوسطى الإفرازي (Otitis Media with Effusion , OME)                | ٢-٢-٤-٢ |
| 7                                     | التهاب الأذن الوسطى القيحي المزمن (Chronic Suppurative Otitis Media , CSOM)    | ٣-٢-٤-٢ |
| 8                                     | التهاب الأذن الداخلية (Otitis Interna)   | ٣-٤-٢   |
| 9                                     | الاحياء المجهرية المسببة لإصابات الأذن (Microorganisms Causing Ear Infections) | ٥-٢     |
| 9                                     | الإصابات الفيروسية (Viral infections)  | ١-٥-٢   |
| 9                                     | الإصابات الفطرية (Fungal Infections)   | ٢-٥-٢   |
| 10                                    | الإصابات البكتيرية (Bacterial Infections)                                      | ٣-٥-٢   |
| 11                                    | الزائفة الزنجارية ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )                            | ٦-٢     |

|    |  |         |
|----|--|---------|
| 12 | التسمية والتصنيف (Nomenclature and taxonomy)   | ١-٦-٢   |
| 13 | وبائية الزائفة الزنجارية (Epidemiology of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )                                      | ٢-٦-٢   |
| 14 | إمراضيه الزائفة الزنجارية (Pathogenicity of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )                                    | ٣-٦-٢   |
| 15 | عوامل ضراوة الزائفة الزنجارية (Virulence factors of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )                            | ٧-٢     |
| 15 | الأصبغ (Pigments)  | ١-٧-٢   |
| 16 | الانزيمات الحالة للدم (Hemolysin)  | ٢-٧-٢   |
| 16 | انتاج إنزيم البروتياز (Protease production)  | ٣-٧-٢   |
| 17 | الاهداد (Type IV Pili)   | ٤-٧-٢   |
| 17 | الأسواط (The flagella)   | ٥-٧-٢   |
| 18 | عديد السكاريد الدهني (Lipopolysaccharide)  | ٦-٧-٢   |
| 18 | استشعار النصاب (Quorum Sensing ,QS)  | ٧-٧-٢   |
| 19 | تكوين الأغشية الحيوية (Biofilm formation)  | ٨-٧-٢   |
| 21 | مقاومة المضادات الحيوية في بكتيريا الزائفة الزنجارية (Antibiotic resistance in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ) | ٨-٢     |
| 22 | مقاومة المضادات الحيوية المتأصلة (Intrinsic Antibiotic Resistant)  | ١-٨-٢   |
| 23 | تقليل نفاذية الغشاء الخارجي (Outer Membrane Permeability)  | ١-١-٨-٢ |
| 24 | مضخات التدفق (Efflux pump)   | ٢-١-٨-٢ |
| 25 | الانزيمات المعطلة للمضادات الحيوية (Antibiotic Inactivating Enzymes)   | ٣-١-٨-٢ |
| 25 | مقاومة المضادات الحيوية التكيفية (Adaptive Antibiotic Resistant)   | ٢-٨-٢   |
| 26 | المقاومة المكتسبة (Acquired Antibiotic Resistance)   | ٣-٨-٢   |

|   |  |          |
|---|--|----------|
| 28  | (Genomic structure of التركيب الجينومي لبكتيريا الزائفة الزنجارية <i>P. aeruginosa</i> )   | ٩-٢      |
| 28  | (جين الرنا الرايبوسومي 16 Svedberg ribosomal ribonucleic acid (gene, 16S rRNA))  | ١٠-٢     |
| 29  | المحددات الجينية لبكتيريا الزائفة الزنجارية في مقاومة المضادات الحيوية (Genetic determinants of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in antibiotics resistance) | ١١-٢     |
| 29  | (موقع بناء عديد السكاريد, polysaccharide synthesis locus, psl)   | ١-١١-٢   |
| 30  | (جينات الاغشية الحيوية الخاصة بمقاومة المضادات الحيوية - Biofilm-specific antibiotics resistance genes)  | ٢-١١-٢   |
| 30  | جين <i>tssC1</i>   | ١-٢-١١-٢ |
| 30  | جين <i>ndvB</i>  | ٢-٢-١١-٢ |
| 31  | نظام الضخ نوع MexAB-OprM   | ٣-١١-٢   |
| 32  | الأهداف الدوائية في الزائفة الزنجارية المنتجة للاغشية الحيوية (Drug targets in biofilm forming <i>P.aeruginosa</i> )                                     | 12-2     |
| 33  | انزيم الأدينيلات كاينيز (Adenylate kinase)   | ١-12-2   |
| <b>الفصل الثالث - المواد وطرائق العمل Materials and Methods</b> |  |          |
| 3٤  | المواد وطرائق العمل  | 3        |
| 3٤  | المواد (Materials)   | 1-3      |
| 3٤  | (Equipments and Laboratory الأدوات والأجهزة المختبرية apparatus)   | 1-1-3    |
| 3٦  | المواد ذات الاستعمال الواحد (Disposable materials)   | ٢-١-٣    |
| 3٧  | الأوساط الزرعوية (Culture media)   | ٣-١-٣    |
| 3٨  | المواد الكيميائية والصبغات (Chemical materials and Stains)   | ٤-١-٣    |
| 4٠  | العُدد (kits)  | ٥-١-٣    |
| 4١  | البادئات (Primers)   | ٦-١-٣    |

|    |   |           |
|----|---|-----------|
| 4٢ | المضادات الحيوية (Antibiotics)  | ٧-١-٣     |
| 4٢ | طرائق العمل (Methods)   | ٢-٣       |
| 4٢ | تصميم الدراسة (Study design)  | 1-2-3     |
| 42 | جمع العينات (Collection of samples)   | ٢-٢-٣     |
| 44 | التعقيم (Sterilization)   | 3-2-3     |
| 44 | تحضير الأوساط الزرعية (Preparation of Culture Media)  | ٤-٢-٣     |
| 44 | الأوساط الزرعية الجاهزة (Ready Made Media)  | ١-٤-٢-٣   |
| 44 | وسط اكار الماكونكي (MacConkey agar)   | ١-١-٤-٢-٣ |
| 44 | وسط الاكار المغذي (Nutrient agar)   | ٢-١-٤-٢-٣ |
| 44 | وسط المرق المغذي (Nutrient broth)   | ٣-١-٤-٢-٣ |
| 44 | وسط اكار السترمييد (Cetrimide agar)   | ٤-١-٤-٢-٣ |
| 45 | وسط السابرويد دكستروز (Sabouraud dextrose agar)   | ٥-١-٤-٢-٣ |
| 45 | وسط مولر هنتون (Mueller Hinton agar)  | ٦-١-٤-٢-٣ |
| 45 | وسط اكار سيمون السترات (Simmons citrate agar)   | ٧-١-٤-٢-٣ |
| 45 | وسط حليب الفرز الصلب (Skim milk Agar medium)  | ٨-١-٤-٢-٣ |
| 45 | وسط اكار ثلاثي السكر والحديد (Triple sugar iron agar)   | ٩-١-٤-٢-٣ |
| 46 | الأوساط الزرعية التركيبية (Prepared Culture Media)  | ٢-٤-٢-٣   |
| 46 | وسط اكار الدم الأساس (Blood agar base)  | ١-٢-٤-٢-٣ |
| 46 | وسط مرق نقيع القلب والدماغ (Brain heart infusion broth)   | ٢-٢-٤-٢-٣ |
| 46 | وسط اكار اليوريا (Urea agar)  | ٣-٢-٤-٢-٣ |
| 46 | وسط الجلاتين (Gelatin media)  | ٤-٢-٤-٢-٣ |
| 47 | الكواشف والمحاليل الكيميائية المستخدمة في تشخيص العزلات قيد الدراسة<br>(The chemical reagents and solutions used in the identification of isolates under study) | ٥-٢-٣     |
| 47 | كاشف الاوكسيديز (Oxidase reagent)   | ١-٥-٢-٣   |

|    |   |              |
|----|---|--------------|
| 47 | كاشف الكاتليز (Catalase reagent)                                      | ٢-٥-٢-٣      |
| 47 | كاشف فوكس بروسكاور (Voges Proskauer reagent)                          | ٣-٥-٢-٣      |
| 47 | كاشف احمر المثيل (Methyl Red reagent)                                 | ٤-٥-٢-٣      |
| 48 | صبغة كرام (Gram Stain)  | ٥-٥-٢-٣      |
| 48 | صبغة البنفسج البلوري (Crystal violet)                                 | ٦-٥-٢-٣      |
| 48 | محلول ثابت العكورة القياسي (محلول ماكفرلاند ٠,٥)                      | ٧-٥-٢-٣      |
| 48 | زرع المسحات (Swab culture)  | ٦-٢-٣        |
| ٤٩ | تشخيص الاجناس الميكروبية (Genus Identification of Microbial Isolates) | ٧-٢-٣        |
| ٤٩ | تشخيص العزلات الفطرية (Identification of fungal isolates)             | 1-7-2-3      |
| ٤٩ | تشخيص العزلات البكتيرية (Identification of bacterial isolates)        | 2-7-2-3      |
| ٤٩ | الصفات الزرعية (Cultural Characteristics)                             | 1-2-٧-٢-٣    |
| ٤٩ | الفحوصات المجهرية (Microscopic Examination)                           | 2-2-٧-٢-٣    |
| ٤٩ | الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests)                              | 3-2-7-2-3    |
| ٤٩ | فحص الأوكسيديز (Oxidase test)   | 1-3-2-7-2-3  |
| 5٠ | اختبار الكاتليز (Catalase test)                                       | 2-3-2-7-2-3  |
| 5٠ | اختبار تحلل الدم (Hemolysis test)                                     | 3-3-2-7-2-3  |
| 5٠ | النمو بدرجتي حرارة ٤ م° و ٤٢ م°                                       | 4-3-2-7-2-3  |
| 5٠ | اختبار فوكس بروسكاور (Voges Proskauer test)                           | 5-3-2-7-2-3  |
| 5٠ | اختبار احمر المثيل (Methyl Red test)                                  | 6-3-2-7-2-3  |
| 5٠ | اختبار الاندول (Indole test)  | 7-3-2-7-2-3  |
| 51 | فحص إنتاج انزيم التجلط (Coagulase test)                               | 8-3-2-7-2-3  |
| 51 | اختبار انزيم اليوريز (Urease test)                                    | 9-3-2-7-2-3  |
| 51 | اختبار استهلاك السترات (Citrate utilization test)                     | 10-3-2-7-2-3 |
| 51 | اختبار ثلاثي السكر والحديد (Triple sugar iron test)                   | 11-3-2-7-2-3 |

|    |   |              |
|----|---|--------------|
| 52 | اختبار تسييل الجيلاتين (Gelatin liquefaction test)  | 12-3-2-7-2-3 |
| 52 | اختبار الحركة (Motility Test)   | 13-3-2-7-2-3 |
| 52 | تشخيص أكثر أنواع البكتيريا شيوعاً باستخدام جهاز الفايتهك (Identification of the most common bacterial species using the Vitek 2 compact system)       | 8-2-3        |
| 53 | اختبار حساسية الزائفة الزنجارية للمضادات الميكروبية (Antimicrobial Susceptibility Test ,AST)  | ٩-٢-٣        |
| 53 | حفظ العزلات البكتيرية وإدامتها (Preservation and Maintenance of Bacterial Isolates)   | ١٠-٢-٣       |
| 53 | الحفظ قصيرة الأمد للعزلات (Short term maintenance)  | ١-١٠-٢-٣     |
| 53 | الحفظ طويل الأمد للعزلات (Long term maintenance)  | ٢-١٠-٢-٣     |
| 54 | الكشف عن بعض عوامل الضراوة في بكتيريا الزائفة الزنجارية (Detection of some virulence factors in <i>P. aeruginosa</i> )                                | ١١-٢-٣       |
| 54 | التحري عن إنتاج صبغة البايوسيانين (Detection of Pyocyanin Production)   | ١-١١-٢-٣     |
| 54 | التحري عن إنتاج البروتياز (Detection of Protease Production)  | ٢-١١-٢-٣     |
| 54 | الكشف المظهري عن مضخات التدفق (Phenotypic detection of efflux pump)   | ٣-١١-٢-٣     |
| 5٥ | الكشف عن قدرة عزلات بكتيريا الزائفة الزنجارية لتكوين الغشاء الحيوي (Detection of biofilm formation ability in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Isolates) | ٤-١١-٢-٣     |
| 5٥ | الكشف النوعي عن الأغشية الحيوية (Qualitative detection of Biofilms)   | 1-4-11-2-3   |
| 5٦ | الكشف الكمي عن الأغشية الحيوية (طريقة صفائح المعايرة الدقيقة) (microtiter plates method)  | 2-11-2-3     |
| 5٧ | التوصيف الجزيئي لبكتيريا الزائفة الزنجارية (Molecular Characterization of <i>P. aeruginosa</i> )  | 12-2-3       |



|    |   |            |
|----|---|------------|
| 5٧ | استخلاص الحامض النووي من بكتيريا الزائفة الزنجارية (DNA Extraction from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ) | 1-12-2-3   |
| 5٨ | تحضير مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR Master Mixture)  | 2-12-2-3   |
| 5٨ | تحضير محاليل البوادي (Primers Solutions)  | 1-2-12-2-3 |
| 58 | مزيج (Master Mix)   | 2-2-12-2-3 |
| ٥٩ | تحضير منتج تفاعل البلمرة المتسلسل ( PCR Product )   | ٣-٢-12-2-3 |
| ٥٩ | اجراء تفاعل البلمرة المتسلسل ( PCR Assay )  | ٤-٢-12-2-3 |
| 60 | الترجيل الكهربائي في هلام الاكاروز (Agarose gel electrophoresis)  | ٣-12-2-3   |
| 60 | صبغة بروميد الاثيديوم Ethidium Bromide stain  | 1-3-12-2-3 |
| 60 | تحضير دارئ (Tris-Borate-EDTA, TBE buffer)   | 2-3-12-2-3 |
| 60 | تحضير هلام الاكاروز (Prepare agarose gel)   | 3-3-12-2-3 |
| 60 | الكشف عن نواتج التضاعف (Detection of Amplification Products)  | ٤-12-2-3   |
| 61 | النمذجة الجزيئية لانزيم الأدينيلات كاينيز (Molecular modeling of adenylate kinase)                      | 13-2-3     |
|    | الفصل الرابع - النتائج والمناقشة  |            |
| 6٢ | النتائج والمناقشة   | -٤         |
| 6٢ | نسبة العزل الميكروبي (Microbial isolation rate)   | ١-٤        |
| 6٢ | تشخيص العزلات الميكروبية (Identification of Microbial Isolates)   | 2-4        |
| 6٢ | تشخيص الأجناس الفطرية (Identification of fungal genera)   | ١-٢-٤      |
| 6٣ | تشخيص العزلات البكتيرية (Identification of bacterial isolate)   | ٢-٢-٤      |

|    |   |         |
|----|---|---------|
| 6٣ | الصفات الزرعية والمجهريية (Cultural and microscopic characteristics)  | ١-٢-٢-٤ |
| 6٤ | الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests)  | ٢-٢-٢-٤ |
| 67 | تشخيص البكتيريا باستخدام جهاز الفايترك (Bacterial identification through the Vitek 2 compact system)  | ٣-٤     |
| 67 | العزلات الميكروبية المشخصة في هذه الدراسة (Identified microbial isolates in this study)   | ٤-٤     |
| 68 | اختبار حساسية بكتيريا الزائفة الزنجارية للمضادات الميكروبية (Antimicrobial susceptibility test of <i>P.aeruginosa</i> )                                       | ٥-٤     |
| 73 | الكشف المظهري لبعض عوامل الضراوة في الزائفة الزنجارية (Phenotypic detection for some virulence factors in <i>P. aeruginosa</i> )                              | ٦-٤     |
| 73 | إنتاج صبغة البايوسيانين (Pyocyanin Pigment Production)  | ١-٦-٤   |
| 74 | إنتاج إنزيم البروتيز (Production of protease)   | ٢-٦-٤   |
| 7٥ | انتاج الهيمولايسين (Hemolysin production)   | ٣-٦-٤   |
| 7٥ | الكشف المظهري عن مضحات التدفق (Phenotypic Detection Of Efflux Pump)   | ٤-٦-٤   |
| 76 | الكشف عن قدرة بكتيريا الزائفة الزنجارية على تكوين الأغشية الحيوية (Detection of biofilm formation among <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )                       | ٥-٦-٤   |
| 7٨ | العلاقة بين تكوين الاغشية الحيوية ومقاومة المضادات الحيوية (Relationship between biofilm formation and antibiotic resistance)                                 | ٧-٤     |
| 8٠ | انتشار عوامل الضراوة المختلفة وارتباطها بمقاومة المضادات الحيوية (Prevalence of different virulence factors and their association with antibiotic resistance) | ٨-٤     |

|   |  |       |
|---|--|-------|
| 81  | التوصيف الجزيئي لبكتيريا الزائفة الزنجارية<br>(Molecular characterization of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )   | ٩-٤   |
| 81  | الكشف الجزيئي عن جين الرنا الريبوسومي ١٦S<br>(16S ribosomal RNA gene)  | ١-٩-٤ |
| 8٣  | الكشف الجزيئي عن جينات تكوين الاغشية الحيوية<br>(Molecular detection of biofilm forming genes)   | ٢-٩-٤ |
| 8٦  | الكشف الجزيئي عن جينات المقاومة المرتبطة بالغشاء الحيوي<br>(Molecular detection of biofilm-associated resistance genes)  | ٣-٩-٤ |
| 88  | الكشف الجزيئي عن الجين <i>mexB</i> في نظام مضخات التدفق<br>(Molecular detection of the <i>mexB</i> gene in the efflux pumps system)  | ٤-٩-٤ |
| 89  | دور مضخات التدفق في تشكيل الغشاء الحيوي ومقاومة المضادات الحيوية<br>(The Role of efflux pumps in biofilm formation and antibiotics resistance)                                     | ١٠-٤  |
| 91  | النمذجة الجزيئية لإنزيم لأدينيلات كائيز في العزلة القياسية لبكتيريا الزائفة الزنجارية<br>(Molecular modeling of adenylate kinase in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 (ATCC3686)) | ١١-٤  |
| <b>الفصل الخامس-الاستنتاجات والتوصيات</b> |  |       |
| 9٤  | الاستنتاجات (Conclusions)  | ١-٥   |
| 9٥  | التوصيات (Recommendations)   | ٢-٥   |
| 9٦  | المصادر-References   |       |

## قائمة الجداول

| الصفحة | العنوان  | رقم الجدول |
|--------|--|------------|
| 3٤     | الأدوات المختبرية والأجهزة المستخدمة في هذه الدراسة  | 1-3        |
| 3٦     | المواد ذات الاستعمال الواحد  | ٢-٣        |
| 3٧     | يوضح جميع الأوساط الزرعية المستخدمة في عزل وتشخيص العزلات الجرثومية                              | ٣-٣        |
| 3٨     | يوضح المواد الكيميائية، الصبغات والمحاليل المستخدمة في هذه الدراسة                               | ٤-٣        |
| 4٠     | العُدد المستعملة في هذه الدراسة  | ٥-٣        |
| 4١     | بائنات بكتيريا <i>Pseudomonas aeruginosa</i> المجهزة من شركة (Macrogen) الكورية                  | ٦-٣        |
| 4٢     | المضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة  | ٧-٣        |
| 58     | مكونات مزيج Master Mix المستخدم في تفاعل البلمرة المتسلسل  | ٨-٣        |
| ٥٩     | المكونات اللازمة لأجراء تفاعل البلمرة المتسلسل   | 9-3        |
| ٥٩     | خطوات برمجة جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل الخاصة بالبوادئ المستخدمة في الدراسة                     | 10-3       |
| 6٥     | الفحوصات الكيموحيوية لتشخيص العزلات البكتيرية  | ١-٤        |
| 66     | الفحوصات الكيموحيوية لأنواع <i>Pseudomonas spp.</i>  | ٢-٤        |
| 71     | اختبار حساسية بكتيريا <i>P. aeruginosa</i> المعزولة من إصابات الأذن                              | 3-4        |
| 74     | إنتاج صبغة البايوسيانين على الأوساط الزرعية المختلفة   | ٤-٤        |
| 7٨     | توزيع بكتيريا <i>P. aeruginosa</i> بحسب انتاجها للغشاء الحيوي باستخدام الطريقتين النوعية والكمية | ٥-٤        |

## قائمة الأشكال

| الصفحة | العنوان  | رقم الشكل |
|--------|--|-----------|
| 5      | تشريح الأذن  | ١-٢       |
| 8      | مراحل التطور لالتهابات الاذن الوسطى بدءًا من الحالة الطبيعية (Normal) إلى التهاب الأذن الوسطى الحاد (AOM) ، ثم إلى التهاب الأذن الوسطى الأفراسي (OME)، وأخيرًا إلى التهاب الأذن الوسطى المزمن (COM)              | ٢-٢       |
| 12     | صورة بالمجهر الإلكتروني لبكتيريا <i>Pseudomonas aeruginosa</i> تحت قوة تكبير (10,000X)   | ٣-٢       |
| 19     | رسم تخطيطي لبعض عوامل الضراوة في بكتيريا <i>P. aeruginosa</i>  | ٤-٢       |
| 2٠     | مراحل تكوين الغشاء الحيوي  | ٥-٢       |
| 2١     | أنماط مقاومة المضادات الحيوية في بكتيريا <i>P. aeruginosa</i>  | ٦-٢       |
| 2٧     | آليات الزائفة الزنجارية في مقاومة المضادات الحيوية   | ٧-٢       |
| 44     | تصميم دراسة  | ١-٣       |
| 6٨     | توزيع الاحياء المجهرية في إصابات الأذن   | ١-٤       |
| 7٦     | طريقة العجلة -أكار بروميد الإثديوم (EtBr) لقياس نشاط مضخات التدفق، يشير التآلق الإيجابي إلى تدفق سلبي (العزلة A) بينما يشير التآلق السلبي إلى تدفق إيجابي (العزلات B, C, D, E, and F)                            | ٢-٤       |
| 8٠     | توزيع مقاومة المضادات الحيوية في العزلات المنتجة للاغشية الحيوية   | ٣-٤       |
| 8١     | توزيع عوامل الضراوة في بكتيريا <i>P. aeruginosa</i> وارتباطها بمقاومة المضادات الحيوية   | ٤-٤       |
| 82     | الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لبكتيريا <i>P. aeruginosa</i> المعزولة من إصابات الأذن باستعمال البادئ لجين <i>rRNA</i> ١٦S (٩٥٦ زوج قاعدي) بتركيز هلام الاكاروز ( ١,٥ %) و فرق جهد (٥٠ فولت) لمدة ساعة واحدة | ٥-٤       |

|    |   |      |
|----|---|------|
| 8٤ | الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لبكتيريا <i>P. aeruginosa</i> المعزولة من إصابات الأذن باستعمال البادئ لجين <i>PsIA</i> (١١٩ زوج قاعدي) بتركيز هلام الاكاروز (١,٥%) و فرق جهد (٥٠ فولت) لمدة ساعة واحدة  | ٦-٤  |
| 8٤ | الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لبكتيريا <i>P. aeruginosa</i> المعزولة من إصابات الأذن باستعمال البادئ لجين <i>PsID</i> (٣٦٩ زوج قاعدي) بتركيز هلام الاكاروز (١,٥%) و فرق جهد (٥٠ فولت) لمدة ساعة واحدة  | ٧-٤  |
| 85 | النمط المظهري والجزيئي لتكوين الاغشية الحيوية   | ٨-٤  |
| 87 | الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لبكتيريا <i>P. aeruginosa</i> المعزولة من إصابات الأذن باستعمال البادئ لجين <i>ndvB</i> (١٥٧ زوج قاعدي) بتركيز هلام الاكاروز (١,٥%) و فرق جهد (٥٠ فولت) لمدة ساعة واحدة  | ٩-٤  |
| 87 | الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لبكتيريا <i>P. aeruginosa</i> المعزولة من إصابات الأذن باستعمال البادئ لجين <i>tssC1</i> (١٥٠ زوج قاعدي) بتركيز هلام الاكاروز (١,٥%) و فرق جهد (٥٠ فولت) لمدة ساعة واحدة.  | ١٠-٤ |
| 89 | الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لبكتيريا <i>P. aeruginosa</i> المعزولة من إصابات الأذن باستعمال البادئ لجين <i>mexB</i> (٢٤٤ زوج قاعدي) بتركيز هلام الاكاروز (١,٥%) و فرق جهد (٥٠ فولت) لمدة ساعة واحدة.   | ١١-٤ |
| 91 | التمثيل البياني للعلاقة بين الاغشية الحيوية وأنظمة التدفق و مقاومة المضادات الحيوية   | ١٢-٤ |
| 92 | (أ) التركيب ثلاثي الابعاد لنموذج إنزيم الادينيلاز كاينيز (Adk) (حلزونات الفا ملونة باللون الأرجواني وصفائح بيتا خضراء اللون).<br>(ب) تنظيم نموذج إنزيم Adk، المناطق الفرعية والوظيفية الثلاثة (domains) احطيت بدوائر والأسهم تشير الى تآرجح منطقة LID و $AMP_{bd}$ باتجاه بعضهما البعض عند الارتباط بالمادة الأساس. | ١٣-٤ |

|    |  |      |
|----|--|------|
| 93 | <p>مخطط راماخاندران لنموذج إنزيم الأدينيلات كابينزفي الزائفة الزنجارية(PAAdk)، التي تم الحصول عليها من برنامج Swiss model. تقع جميع الأحماض الامينية في المناطق المفضلة أو المسموح بها (المنطقة الاولى والثانية ا و II ) ، بينما تملو المنطقة الثالثة III (غير المفضلة أو غير المسموح بها ) من الأحماض الامينية.</p> | 14-4 |
|----|--|------|

#### قائمة المختصرات

| المختصر           | المصطلح   |
|-------------------|---|
| 16Sr RNA          | 16 Svedberg ribosomal ribonucleic acid            |
| ABC               | ATP-Binding Cassette                              |
| Adk               | Adenylate kinase                                  |
| AdV               | Adenovirus  |
| AMP <sub>bd</sub> | AMP-binding subdomain                             |
| AOM               | Acute Otitis Media                                |
| AST               | Antimicrobial Susceptibility Test                 |
| ATCC              | American Type Culture Collection                  |
| ATP               | Adenosine Triphosphate                            |
| Bp                | Base pair   |
| BpAdk             | <i>Burkholderia pseudomallei</i> adenylate kinase |
| PBPs              | penicillin-binding proteins                       |
| CSOM              | Chronic Suppurative Otitis Media                  |
| DNA               | Deoxyribonucleic Acid                             |
| dNTP              | Deoxynucleoside triphosphate                      |
| EAC               | External Auditory Canal                           |
| EDTA              | Ethylendiaminetetraacetic acid                    |
| ELISA             | Enzyme Linked Immunosorbent Assay                 |
| EPS               | Extracellular Polymeric Substances                |
| ET                | Eustachian tube                                   |
| EtBr-CW           | Ethidium bromide agar-cartwheel method            |
| GN-ID             | Gram Negative identifier                          |
| HGT               | horizontal gene transfer                          |

|       |  |
|-------|--|
| HMPV  | human metapneumovirus                            |
| IAV   | Influenza A Virus                                |
| K/K   | Alkaline/ Alkaline                               |
| KEGG  | Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes          |
| LasA  | ElastaseA  |
| LasB  | Elastase B                                       |
| LID   | ATP-binding subdomain                            |
| LPS   | Lipopolysaccharide                               |
| MATE  | Multidrug and Toxic Compound Extrusion           |
| MDR   | Multidrug-Resistant                              |
| MFS   | Major facilitator superfamily                    |
| MR-VP | Methyl red -Voges Proskauere                     |
| MTP   | microtiter plates                                |
| NCBI  | National Center for Biotechnology<br>Information |
| NMR   | Nuclear magnetic resonance                       |
| OD    | Optical Density                                  |
| OE    | Otitis externa                                   |
| OI    | Otitis Interna                                   |
| OM    | Otitis media                                     |
| OME   | Otitis Media with Effusion                       |
| PAAdk | Pseudomonas aeruginosae adenylate kinase         |
| PACE  | Proteobacterial Antimicrobial Compound           |
| PCR   | Polymerase chain reaction                        |
| PDB   | Protein Data Bank                                |
| PDR   | Pan Drug-Resistant                               |
| PLs   | Phospholipids                                    |
| Psl   | polysaccharide synthesis locus                   |
| QS    | Quorum Sensing                                   |
| RND   | Resistance-nodulation division                   |
| RSV   | Respiratory Syncytial Virus                      |
| RV    | Rhinovirus                                       |



|                    |                              |
|--------------------|------------------------------|
| SMR                | Small Multidrug Resistance   |
| $\beta$ -lactamase | Beta lactamase               |
| T6SS               | The type VI secretion system |
| TBE                | Tris-Borate-EDTA             |
| WHO                | World Health Organization    |
| XDR                | extensively drug-resistant   |

الفصل الأول

المقدمة

Introduction

## المقدمة

في جميع أنحاء العالم، هناك أكثر من ٣٦٠ مليون شخص يعانون من ضعف السمع في بعض الحالات يمكن أن تؤدي هذه الإصابات إلى مضاعفات خطيرة تهدد الحياة، مثل ضعف السمع، أو خراج الدماغ، أو التهاب السحايا، وغالبًا ما يحدث ذلك في مرحلة الطفولة وفي أواخر العمر (Thomas *et al.*, 2014;WHO, 2016 ;Getaneh *et al.*, 2021)

الأذن البشرية وهي واحدة من أكثر أعضاء الحس تطورًا، وهي تنقسم إلى ثلاثة أجزاء، الجزء الخارجي الذي يحتوي على الصيوان والقناة السمعية، يمرر الاهتزازات الصوتية إلى غشاء الطبلة الذي يفصل بين الأذن الخارجية والوسطى. تحتوي الأذن الوسطى على العظيماث الثلاث (المطرقة، السندان، والركاب) تستقبل الاهتزازات وتضخمها، وتنتقل الاهتزازات عبر الأذن الوسطى إلى الأذن الداخلية الحاوية على الدهليز والقوقعة الحلزونية الشكل كعضو حسي ، تحتوي القوقعة على أهداب ترسل الإشارة العصبية إلى الدماغ وبهذه الطريقة يتم تحويل هذه الاهتزازات إلى صوت (Sheikh *et al.*, 2022).

تتمتع الأذن بمجموعة من آليات الدفاع تتمثل بالجلد السليم للقناة السمعية الخارجية والغدد الدهنية، والغدد التي تفرز مادة شمعية، المادة الشمعية تتمتع بخصائص كارهة للماء وتمنع احتباس الماء في قناة الأذن، كما تُشكّل طبقة واقية على سطح الجلد وتظهر خصائص مضادة للميكروبات بسبب انخفاض الرقم الهيدروجيني لها (Swain *et al.*, 2019;Saputra *et al.*, 2021)، إلا أنه قد تحدث الإصابة نتيجة الأضرار التي تصيب الجلد كحاج آلي والاستخدام المتكرر لساعات الأذن، واستخدام الأدوات الصلبة لتنظيف الأذن، إلى جانب الإفراط في استخدام المواد الكيميائية والمطهرات بالإضافة إلى الطبيعة المتنوعة لمسببات الأمراض والدور الذي تلعبه في التهرب من الجهاز المناعي للمضيف ( Abdelazeem *et al.*, 2015; Rawat *et al.*, 2017;Bojanović *et al.*, 2022).

يمكن أن تحدث الإصابة في الأجزاء الخارجية من الأذن ( Otitis Externa ,OE) أو في الأجزاء الوسطى (Otitis Media , OM) أو في الأجزاء الداخلية من الأذن(Otitis Interna , OI) (Szmuiłowicz and Young, 2019). يُعدُّ التهاب الأذن الوسطى احد أكثر الأمراض شيوعاً وأهمها في العالم، الذي يمكن أن يصنف الى التهاب الأذن الوسطى الحاد (Acute Otitis Media ,AOM) ، و التهاب الأذن الوسطى الإفرازي (Otitis Media with Effusion,OME) و التهاب الأذن الوسطى المزمن(Chronic Suppurative Otitis Media,CSOM) (Schilder *et al.*, 2016).

تتوزع العوامل المسببة لإصابات الأذن بين بكتيرية وفيروسية وفطرية. ومع ذلك، فإن العوامل الرئيسية المسببة لإصابات الأذن هي البكتيريا مثل *Escherichia coli*، والمكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* والمكورات العقدية *Streptococcus spp.*، و *Proteus mirabilis* والكليبيلا الرئوية *Klebsiella pneumoniae* (Omosigho et al., 2019; Getaneh et al., 2021).

تعد بكتيريا *P. aeruginosa* المسبب الأكثر شيوعاً في إصابات الأذن ويرجع ذلك إلى امتلاكها مزيج من المقاومة المتأصلة والمكتسبة والتكيفية (Langendonk et al., 2021). بالإضافة إلى ذلك تستخدم *P. aeruginosa* مجموعة واسعة من عوامل الضراوة، مثل النوع الرابع من الاهداب (type IV Pili)، والأسواط (flagella) واستشعار النصاب (quorum sensing) وتكوين الأغشية الحيوية (biofilm formation)، وأنظمة إفراز مختلفة (secretion systems) للتكيف والبقاء على قيد الحياة في بيئات قاسية متنوعة وفي ظل الحد الأدنى من الظروف البيئية. تعمل هذه العوامل على زيادة التعبير عن الجينات التي تؤدي إلى زيادة المقاومة منها جينات تكوين الاغشية الحيوية وهما *psIA* و *psID* (Hemmati et al., 2024).

تتوسط آلية مقاومة المضادات الحيوية المرتبطة بالأغشية الحيوية جينات *ndvB* و *tssC1*، يشفر جين *ndvB* لإنزيم (glucosyltransferase) الذي يساهم في إنتاج الكلوكان الحلقي ويعزز المقاومة من خلال عزل العوامل المضادة للميكروبات بعيداً عن هدفها الخلوي. في حين تتوسط المقاومة للمضادات الحيوية بواسطة جين *tssC1*، وهو احد جينات النظام الإفرازي (النوع السادس) (Zhang et al., 2012; Beaudoin et al., 2011).

يرتبط تطوير الأغشية الحيوية ومقاومة المضادات الحيوية ارتباطاً وثيقاً بنشاط مضخات التدفق. تطلق الخلايا البكتيرية مواد ضارة في البيئة المحيطة من خلال سلاسل البروتين الموجودة في أغشيتها والتي تسمى بمضخات التدفق، توجد عادةً في جميع أنواع البكتيريا إذ تتواجد جينات تشفر لمكونات مضخات التدفق على الكروموسومات أو البلازميدات. في الأنواع البكتيرية السالبة لصبغة كرام، تنتمي الغالبية العظمى من مضخات التدفق إلى عائلة تقسيم العقيدات المقاومة Resistance-nodulation division (RND) (Auda et al., 2020). تشمل هذه الأنظمة في بكتيريا *P.aeruginosa* على MexAB-OprM، MexEF-OprN، MexCD-OprJ، و MexXY-OprM. يلعب فرط تعبير MexB دوراً

أساسيًا في المقاومة المتأصلة لبكتيريا *P.aeruginosa* ضد مجموعة من مضادات الميكروبات وهي التتراسايكليينات (tetracyclines) والفلوروكينولونات (fluoroquinolones) ومضادات بيتا لاكتام ( $\beta$ -lactams) بما في ذلك الكاربابينيم (carbapenem) (Kello et al., 2023).

بالنظر لأهمية الأذن بوصفها عضوًا حسيًا للإنسان وتأثير الأحياء المجهرية على أجزاء الأذن المختلفة وتسببها في إصابات خطيرة تهدد حياة الإنسان، هدفت هذه الدراسة إلى تقييم خطورة نوع البكتيريا الأكثر شيوعًا في إصابات الإذن. يمكن تحقيق هدف الدراسة من خلال الخطوات الآتية:

١. عزل الأحياء المجهرية الهوائية من إصابات الأذن المختلفة وتحديد أجناسها بالطرائق الزرعية والمظهرية والكيموحيوية وتشخيص النوع الشائع في احداث الإصابة باستخدام جهاز الفايثك.
٢. تشخيص النوع البكتيري الأكثر شيوعًا المعزول من أفرات الأذن القححية بالطرائق الجزيئية.
٣. تحديد أنماط المقاومة المختلفة للنوع البكتيري الأكثر ترددًا في هذه الدراسة تجاه بعض المضادات الحيوية.
٤. التحري عن بعض عوامل الضراوة ذات الصلة المحتملة بنشوء المقاومة للمضادات الحيوية في النوع البكتيري قيد الدراسة.
٥. تحديد مدى تأثير الأغشية الحيوية والسكريات خارج الخلوية في زيادة صعوبة مكافحة الالتهابات الناجمة عن ذلك النوع البكتيري.
٦. تقييم العلاقة بين الأنماط الجينية والمظهرية لمقاومة المضادات الحيوية، وتكوين الأغشية الحيوية، ونشاط مضخات التدفق. مما يساعد في تطوير استراتيجيات أكثر فعالية لمكافحة الالتهابات الناجمة عن هذه البكتيريا.
٧. التنبؤ عن التركيب ثلاثي الأبعاد لأهداف دوائية محتملة في البكتيريا قيد الدراسة بطرائق الحوسبة الاحيائية.

الفصل الثاني

استعراض المراجع

**Literatures Review**

## ١-٢: الأذن (The Ear)

الأذن هي عضو حسي معقد مسؤول عن السمع والتوازن، تشكل الاضطرابات المرتبطة بالتهاب الأذن مجموعة واسعة من الحالات الالتهابية التي قد تشمل الأذن الخارجية أو الوسطى أو الداخلية، وكل جزء منها معرض للإصابة بمسببات الأمراض ويمكن أن تنتج مجموعة من المشاكل المعقدة (Barritt, 2014).

## ٢-٢: أجزاء الأذن (Ear Parts)

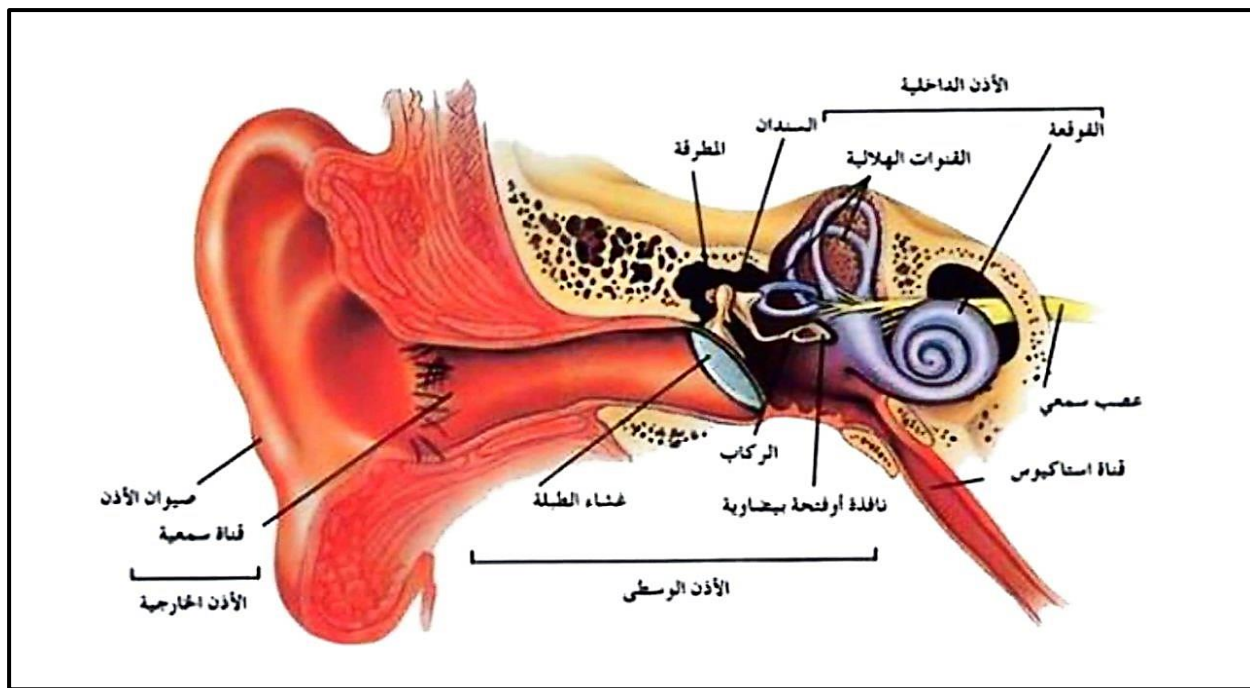
تنقسم الأذن إلى ثلاثة أجزاء متميزة وهي الأذن الخارجية والأذن الوسطى والأذن الداخلية.

تشمل الأذن الخارجية صيوان الأذن وقناة الأذن الخارجية، إذ يحتوي كلاهما على ظهارة حرشفية طبقية كيراتينية مبطنة. تقوم الأذن الخارجية على توجيه الطاقة الصوتية والاهتزازات من قناة الأذن إلى بنية من النسيج الضام يدعى بغشاء الطبلة (Tympanic Membrane) يفصل القناة السمعية الخارجية عن تجويف الأذن الوسطى (Niekrash, 2021).

تنقسم قناة الأذن الخارجية إلى جزء جانبي يتكون من غضروف مرن ، وجزء وسطي يتكون من شعيرات صغيرة ، وغدد مفرزة متخصصة تنتج مادة شمعية صفراء- بنية اللون ذات درجة حامضية قليلاً تمنع الإصابة عن طريق احتجاز الكائنات الحية الدقيقة، والعرق والأوساخ وخلايا الجلد الميتة ، بالإضافة الى ذلك تحتوي قناة الأذن الخارجية على شعيرات تصطف بداخلها لتدفع الأجسام الغريبة نحو فتحة الأذن، مع ذلك يمكن أن يؤدي الكثير من المادة الشمعية إلى انسداد القناة السمعية وتؤثر عملية السمع، مما قد يؤدي إلى فقدان السمع التوصيلي (Krause, 2009; Ansari et al., 2019).

الأذن الوسطى عبارة عن تجويف يمتد من غشاء الطبلة إلى النافذة البيضاوية للأذن الداخلية، مع بطانة من الظهارة الحرشفية الطبقة غير الكيراتينية ، يمتلئ هذا التجويف بالهواء ويتصل بالبلعوم الأنفي بوساطة قناة استاكيوس الذي يسمح بمساواة الضغط للأذن الوسطى، وقد يكون بمثابة طريق لانتشار العدوى من البلعوم الأنفي إلى تجويف الأذن الوسطى ، والدور الأساسي للأذن الوسطى هو نقل الاهتزاز من غشاء الطبلة إلى الأذن الداخلية عبر ثلاثة عظام صغيرة، هذه العظيومات بالترتيب من غشاء الطبلة إلى الأذن الداخلية المطرقة (Malleus) والسندان (Incus)، والركاب (Stapes) (Anthwal and Thompson, 2016).

تقع الأذن الداخلية في التيه العظمي (Bony labyrinth) للعظم الصدغي وتتكون من جزئين متميزين يوديان وظيفتين منفصلتين هما تجويف في الأذن الداخلية مملوء بقنوات نصف دائرية مسؤولة عن التوازن يسمى الدهليز (Vestibule) ، وتجويف حلزوني الشكل يسمى بالقوقعة (cochlea) يبدو مشابهاً لصدفة الحلزون ومملوء بسائل إضافة الى الآلاف من الخلايا الحسية الشعرية الصغيرة، إذ تقوم هذه الخلايا بتحويل الاهتزازات الصوتية القادمة من الأذن الوسطى إلى إشارات عصبية يتم نقلها إلى الدماغ عبر العصب السمعي ليقوم الدماغ بتفسيرها ( Hain and Helminski, 2007; Ekdale, 2016 ) وكما هو موضح في الشكل ١-٢.



الشكل ١-٢: تشريح الأذن (ملوحي، ٢٠٢٣)

### ٣-٢: الحواجز المناعية في الأذن (Immunological Barriers Of The Ear)

يُعدُّ الانتقال بواسطة الحواجز الطبيعية للجسم أحد أهم التحديات التي تواجه مسببات الأمراض الميكروبية، وتمثل هذه العملية تحديًا خاصًا بالنسبة لمسببات الأمراض الانتهازية، لأنها تفتقر إلى بعض الآليات اللازمة للسمية والغزو والتي تمكن مسببات الأمراض الأولية من التغلب على الجهاز المناعي للمضيف (Golovkine *et al.*, 2018).



يُعدُّ الجلد السليم للقناة السمعية الخارجية بمثابة حاجز آلي يمنع دخول الكائنات الحية الدقيقة من البيئة الخارجية، كما أنها تحتوي على غدد عرقية ، ودهنية ، بالإضافة إلى الغدد الشمعية التي تفرز شمع الأذن (Ear wax) ولها خصائص كارهة للماء وتمنع احتباس الماء في قناة الأذن ، كما تشكل المادة الشمعية طبقة واقية على سطح الجلد وتظهر خصائص مضادة للميكروبات بسبب انخفاض الرقم الهيدروجيني له ، مما يخلق ظروفًا غير مناسبة لنمو مسببات الأمراض (Adegbiji *et al.*, 2014; Asri *et al.*, 2018).

من ناحية أخرى تمتلك البطانة الظهارية للأذن الوسطى العديد من آليات الدفاع على سبيل المثال، تفرز الخلايا الظهارية الميوسين وجزيئات الدفاع الأخرى مثل الإنترفيرونات (Interferons) واللاكتوفيرين (Lactoferrin) لمهاجمة واحتجاز مسببات الأمراض، والتي يتم نقلها نحو البلعوم الأنفي عبر أنبوب استاكيوس (Eustachian tube , ET) ، بالإضافة إلى ذلك تتفاعل الأذن الداخلية مع الجهاز المناعي عن طريق التصريف للمفاوي والدورة الدموية لحماية نفسها من الالتهابات والإجهاد مثل الصدمات الصوتية (Leichtle *et al.*, 2011; Kurabi *et al.*, 2016) .

## ٢-٤: الأنواع الرئيسية لالتهابات الأذن (Main Types of Ear Infections)

### ٢-٤-١: التهاب الأذن الخارجية (Otitis Externa , OE)

هو التهاب في القناة السمعية الخارجية يشمل الحالات الحادة والمزمنة، التهاب الأذن الخارجية الحاد، الذي قد يكون منتشرًا أو موضعيًا وغالبًا ما يكون معديًا في الأصل ويتميز ببداية سريعة (أقل من ٦ أسابيع) بينما يستمر التهاب الأذن الخارجية المزمن أكثر من ٣ أشهر (Medina-Blasini and Sharman, 2020) ، يحدث عند التعرض للماء لفترات طويلة، مما يؤدي إلى ضعف آليات الدفاع الطبيعية في الأذن الخارجية ويتغير الرقم الهيدروجيني للقناة السمعية، مما يسمح بنمو البكتيريا المسببة للأمراض. في الولايات المتحدة، العوامل البكتيرية تشارك في أكثر من ٩٠ % من حالات التهاب الأذن الخارجية وتشمل الأكثر شيوعًا بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* والمكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* بالإضافة إلى المسببات الفطرية الناجمة عن أنواع مثل عفن *Aspergillus niger* وخميرة *Candida spp.* (Long, 2013).

### ٢-٤-٢: التهاب الأذن الوسطى (Otitis Media , OM)

يبدأ التهاب الأذن الوسطى كعملية التهابية تتبع عدوى فيروسية في الجهاز التنفسي العلوي تشمل الغشاء المخاطي للأنف ، والبلعوم الأنفي والغشاء المخاطي للأذن الوسطى وقتاني استاكيوس ، بسبب ضيق المساحة التشريحية للأذن الوسطى، فإن الوذمة (Edema) الناتجة عن العملية الالتهابية تسد أضيق جزء من قناة استاكيوس مما يؤدي إلى انخفاض التهوية، يؤدي هذا إلى سلسلة من الأحداث تؤدي إلى زيادة الضغط في الأذن الوسطى، وزيادة الإفرازات من الغشاء المخاطي، وتراكم الإفرازات المخاطية، مما يسمح باستعمار الكائنات البكتيرية والفيروسية في الأذن الوسطى. يؤدي نمو هذه الميكروبات في الأذن الوسطى إلى تقيح، وفي النهاية، يتجلى ذلك سريريًا من خلال انتفاخ غشاء الطبلة وافراز سوائل الأذن الوسطى القيحية (Danishyar and Ashurst, 20٢٤).

تصنف التهاب الأذن الوسطى إلى أنواع مختلفة بناءً على الأعراض السريرية والمضاعفات المرتبطة بها وكما موضح في الشكل ٢-٢.

#### ٢-٢-٤-١: التهاب الأذن الوسطى الحاد (Acute Otitis Media , AOM)

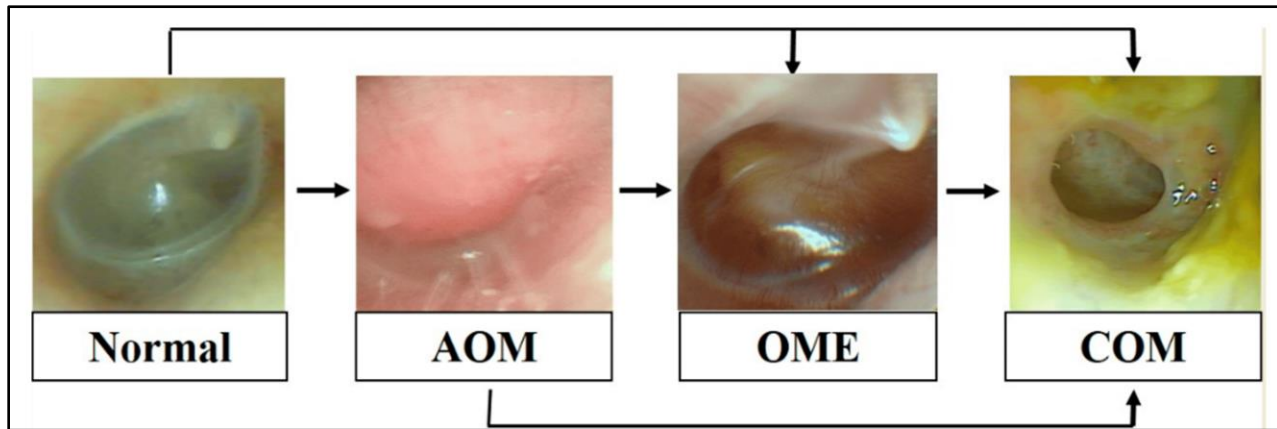
يحدث هذا النوع من الالتهابات نتيجة الإصابة الفيروسية في الجهاز التنفسي العلوي، ويكون أكثر انتشارًا في مرحلة الطفولة. تشير الدراسات إلى أن (٦٠-٨٠) % من الأطفال يعانون من نوبة واحدة على الأقل عند عمر سنة واحدة، ويعاني العديد منهم من نوبات متعددة خلال السنوات الثلاث الأولى من حياتهم ، تنخفض نسبة الإصابة بالتهاب الأذن الوسطى الحاد بعد عمر ٧ سنوات، وهي نادرة عند المراهقين والبالغين (Monasta et al., 2012; Pichichero, 2013).

#### ٢-٢-٤-٢: التهاب الأذن الوسطى الإفرازي (Otitis Media with Effusion , OME)

يُعدُّ OME أحد الأمراض المعدية الأكثر شيوعًا عند الأطفال، وهو السبب الشائع لفقدان السمع المكتسب في مرحلة الطفولة (Sudhoff, 2016 ;Coleman and Cervin, 2019) ، كما أكدت الدراسات أن الأغشية الحيوية تعمل محفزًا التهابيًا مزمنًا يؤدي إلى التهاب الأذن الوسطى الإفرازي ( Daniel et al., 2012; Schulze., et al 2021).

#### ٢-٢-٤-٣: التهاب الأذن الوسطى القيحي المزمن (Chronic Suppurative Otitis Media , CSOM)

هو التهاب مستمر في الأذن الوسطى أو تجويف الخشاء (Mastoid Cavity)، ويعرف أيضاً بالتهاب الأذن الوسطى المزمن (Chronic Otitis Media)، والتهاب الخشاء المزمن (Chronic Mastoiditis)، ويتميز التهاب الأذن الوسطى الفيحي المزمن بإفرازات أذنية متكررة أو مستمرة (سيلان أذني) لمدة تتراوح بين (٢-٦) أسابيع من خلال ثقب غشاء الطبلة. يبدأ التهاب الأذن الوسطى الفيحي المزمن عادة كمضاعفات لالتهاب الأذن الوسطى الحاد المستمر (AOM) في مرحلة الطفولة (Morris, 2012) ، بحسب ما هو موضح في الشكل ٢-٢.



الشكل ٢-٢: مراحل التطور لالتهابات الأذن الوسطى بدءاً من الحالة الطبيعية (Normal) إلى التهاب الأذن الوسطى الحاد (AOM) ، ثم إلى التهاب الأذن الوسطى الإفرازي (OME)، وأخيراً إلى التهاب الأذن الوسطى المزمن (COM) (Jung et al., 2021) .

### ٢-٤-٣: التهاب الأذن الداخلية (Otitis Interna)

غالبًا ما يشمل تصنيف الاضطرابات الالتهابية في الأذن الداخلية التهاب التيه (Labyrinthitis) ، و التهاب العصب الدهليزي (Vestibular Neuritis) ، يشير التهاب التيه إلى مجموعة من الاضطرابات الالتهابية التي تؤثر على كل من القوقعة والدهليز، ويمكن أن يكون سببها فيروسي أو بكتيري ، يُعدّ السبب الأكثر شيوعاً لالتهاب التيه هو الالتهاب الفيروسي الناتج من عدوى الجهاز التنفسي العلوي (Fowler and Boppana, 2018) ، اما التهاب التيه البكتيري ينشأ عادةً من التهاب السحايا الجرثومي أو التهاب الأذن الوسطى (Wu et al., 2012) . يُعد فقدان السمع وعدم التوازن من السمات المميزة لالتهاب التيه ويساعد على تمييزه عن حالة التهاب الجيوب الأنفية و التهاب العصب الدهليزي. بينما يؤدي تلف الاخير إلى اختلال التوازن والدوار، فيما يبقى السمع سليماً لأن القوقعة لا تتأثر (Le et al., 2019).

## ٥-٢: الأحياء المجهرية المسببة لإصابات الأذن (Microorganisms Causing Ear Infections)

### ١-٥-٢: الإصابات الفيروسية (Viral infections)

تؤثر هذه الإصابة سلبيًا على الغشاء المخاطي للبلعوم الأنفي ووظائف أنبوب استاكيوس (Eustachian Tube, ET) عن طريق تعديل الوظيفة المناعية للمضيف، وتحفيز نشاط الحركات الخلوية (Cytokines)، وتنظيم مستضدات سطح الخلية المضيفة التي تعمل كمستقبلات بكتيرية وتزيد من الاستعمار الجرثومي (Marom et al., 2012; Schilder et al., 2016).

ارتبطت فيروسات الجهاز التنفسي بالتهاب الأذن الوسطى الحاد، إذ تم اكتشافها في سائل الأذن الوسطى، أو عن طريق مسحة البلعوم الأنفي خلال نوبة التهاب الأذن الوسطى الحاد، وتشمل الفيروسات الأنفية (Rhinovirus, RV)، والفيروس الخلوي التنفسي (Respiratory Syncytial Virus, RSV)، والفيروسات الغدية (Adenovirus, AdV)، والفيروسات الرئوية البشرية (Human Metapneumovirus, HMPV)، وفيروس الأنفلونزا نوع A (Influenza A Virus, IAV) (Chonmaitree et al., 2016; Schilder et al., 2016). في العديد من الدراسات، يعد فيروس الأنف (RV) هو الفيروس الأكثر شيوعًا، الذي تم اكتشافه في الأطفال المصابين بالتهاب الأذن الوسطى الحاد (Yatsyshina et al., 2016)، وفي دراسة أخرى تم اكتشاف الفيروس الخلوي التنفسي بشكل شائع في إصابات الأذن (Sawada et al., 2019).

### ٢-٥-٢: الإصابات الفطرية (Fungal Infections)

هي عدوى في صيوان الأذن والقناة السمعية الخارجية (External Auditory Canal EAC) غالبًا ما تكون من دون أعراض في المراحل المبكرة، ولا تعد مهددة للحياة (Agarwal and Devi, 2017)، ولكن في الحالات الشديدة يمكن أن تنتشر وتؤثر على الأذن الوسطى في حوالي ١٠% من الحالات

(Roohi et al., 2023) ، بالإضافة إلى تضرر الأنسجة الرخوة المحيطة، بما في ذلك الغدة النكفية، ونادرًا ما قد تمتد إلى عظم الخشاء والمفصل الصدغي الفكي وقاعدة الجمجمة وتعدُّ أخطر حالات الإصابة الفطرية المرتبطة في الغالب بحالات نقص المناعة (Sujatha, 2022) .

لقد ازدادت حالات الإصابة الفطرية وتنوع الفطريات المسببة للأمراض بشكل كبير في السنوات الأخيرة إذ يتراوح معدل انتشارها في جميع أنحاء العالم من (9-30) % (Mofatteh et al., 2018). وعلى الرغم من أن هناك مجموعة واسعة من الأجناس الفطرية مثل *Aspergillus* و *Penicillium* و *Mucor*، *Rhizopus* و *Scopulariopsis* و *Absidia* و *Candida*، فإن أجناس *Aspergillus* و *Candida* هي العوامل المسببة الأكثر شيوعاً (Tasic-Otasevic et al., 2020) .

يتمّ تصنيف العوامل التي تساهم في تطور هذه الإصابة إلى العوامل البيئية والعوامل المشتقة من المضيف ، ويُعدُّ ارتفاع درجة الرطوبة والطقس الحار ووجود الغبار في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية ، هو عامل الخطر الخارجي الأكثر أهمية، وهذه الميزات تساعد على انتشار ونمو العفن (Abdelazeem et al., 2015).

تشمل عوامل الخطر المتعلقة بالمضيف السمات التشريحية المحددة للقناة السمعية الخارجية ، بالإضافة إلى إن الاستخدام المفرط لقطرات الأذن المضادة للبكتيريا، يمكن أن يخل بتوازن الكائنات الحية الدقيقة ويؤدي هذا الخلل في كثير من الأحيان إلى انخفاض عدد البكتيريا، مما قد يؤدي بدوره إلى فرط نمو الفطريات وزيادة خطر الإصابة بالالتهابات الفطرية (Anwar and Gohar, 2014) .

ترتبط هذه الإصابة عادةً بمجموعة من الأعراض، بما في ذلك الحكّة وسيلان الأذن والإحساس بانسداد قناة الأذن ، ومن الشائع أيضًا حدوث الألم، الذي يمكن أن يختلف في شدته، والصداع، وطنين الأذن ، وغالبًا ما تكون الودمة والأحمرار في القناة السمعية الخارجية ، وتقرش الظهارة، وضعف السمع من النتائج السريرية الموجودة في المرضى الذين يعانون من الإصابات الفطرية (Hagiwara et al., 2019).

## ٢-5-٣: الإصابات البكتيرية (Bacterial Infections)

الإصابة البكتيرية هي السبب الرئيس لالتهاب الأذن الوسطى الحاد والمتكرر، إذ يؤدي إلى تضخم ظهارة الطبلة وانصباب الأذن الوسطى وارتشاح كريات الدم البيضاء في تجويف الطبلة، وتختلف مسببات وتكرار

وأنماط مقاومة مضادات الميكروبات باختلاف المناطق الجغرافية والظروف المناخية وفقاً لنتائج العديد من الدراسات، فإن بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) والمكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus*، و *Protus mirabilis*، و *Klebsiella spp.* و *Escherichia coli* هي الكائنات الحية الدقيقة الشائعة المعزولة من حالات إصابات الأذن (Qurban et al., 2017; Getaneh et al., 2021).

من بين مسببات الأمراض المذكورة، تُعدُّ بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* واحدة من أكثر أنواع البكتيريا شيوعاً التي تؤدي إلى التهاب الأذن الوسطى القحبي المزمن، وتصل إلى اللف المحيطي عن طريق الدخول عبر النافذة المستديرة. فضلاً عن ذلك، يمكن أن يؤدي التهاب الأذن الوسطى المتكرر إلى تدمير هياكل الأذن مثل العظام الصغيرة، أو العصب القحفي السابع أو الأذن الداخلية، مما يؤدي إلى فقدان السمع الدائم (Khairkar et al., 2023).

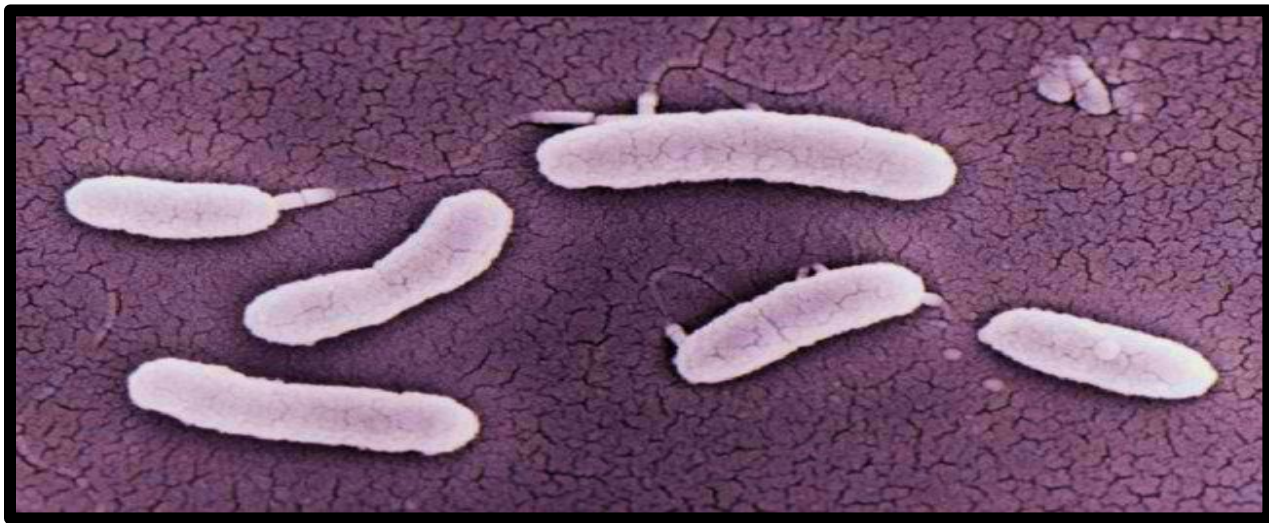
## ٦-٢: الزائفة الزنجارية (*Pseudomonas aeruginosa*)

تتصف بكتيريا *P. aeruginosa* على أنها عصيات هوائية سالبة لصبغة كرام، توجد إما بشكل منفرد أو على شكل أزواج أو في سلاسل قصيرة إذ يتراوح طولها حوالي (١-٥) ميكروميتر وقطرها (٠,٥ - ١,٠) ميكروميتر (Diggle and Whiteley, 2020). متحركة لأنها تحتوي على سوط قطبي (Polar flagellum)، أوعده أسواط (الشكل ٢-٣). يمكن أن تنمو البكتيريا عند درجة حرارة تصل إلى ٤٢ م° في حين أن درجة الحرارة المثلى لنموها ٣٧ م°، إذ إنها تستطيع أن تبقى وتنمو حتى بوجود ظروف نمو بسيطة، إذ لوحظ أنّ لها القدرة على النمو حتى في الماء المقطر الذي يحتوي على عناصر غذائية بسيطة، وهذا يساعدها على البقاء لمدة طويلة على السطوح والمعدات الطبية فتسبب بذلك عدوى المستشفيات (Nosocomial infection) (Abdul-Hussein and Atia, 2016).

ولهذه البكتيريا القابلية على النمو في وسط الدم وتحليل كريات الدم الحمراء، إذ عند زراعتها على وسط أكار الدم (Blood agar)، تظهر مستعمراتها بلون داكن، بالإضافة إلى ذلك تظهر مستعمرات بكتيريا *P. aeruginosa* بشكل غير منتظمة الحواف عديمة اللون، أو شاحبة عند زراعتها على وسط الماكونكي (MacConkey agar) بسبب عدم قدرتها على تخمير سكر اللاكتوز (Sekhi, 2024)، وتتميز بأن لها رائحة تشبه رائحة العنب بسبب إطلاق المركب العطري (Aminoacetophenone) (Davis et al., 2020) فضلاً عن ذلك، تمتلك هذه البكتيريا القابلية على إفراز أصباغ مختلفة، بما في ذلك البايوسيانين

(Pyocyanin) ذات اللون الأزرق المخضر، صبغة البايوفردين (Pyoverdine) تظهر بلون أصفر مخضر والبايوميلانين (Pyomelanin) بلون أسود داكن (Sastry and Bhat, 2018).

تعطي هذه البكتيريا نتيجة إيجابية في اختبار الكاتليز (Catalase) واختبار الأوكسيديز (Oxidase) وفيما يخص اختبارات IMVIC، تكون نتائجها سلبية في اختبار الأندول (Indole)، وأحمر الميثيل (Methyl Red)، وفوكس بروسكاور (Voges Proskauer)، كما تعطي نتيجة إيجابية في اختبار استهلاك السترات (Citrate Utilization). تفتقد هذه البكتيريا القدرة على تخمير السكر، ولا تنتج غاز كبريتيد الهيدروجين (H<sub>2</sub>S) (Hussein et al., 2019).



الشكل ٢-٣: صورة بالمجهر الإلكتروني لبكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* تحت قوة تكبير (10000X) (Senba and Watanabe, 2015)

### ١-٦-٢: التسمية والتصنيف (Nomenclature and Taxonomy)

عزلت هذه البكتيريا بصورة نقية لأول مرة من جروح الجنود الذين كانت ضماداتهم ذات القيح الأخضر المزرق في عام ١٨٨٢ من قبل العالم الفرنسي Carle Gessard وأطلق عليها اسم *Bacillus pyocyaneus* وقد جذبت هذه الصبغة المميزة (Pyocyanin) انتباه العديد من الباحثين، بعدها اقترح العالم الفرنسي Walter Migula لأول مرة جنس *Pseudomonas* في عام ١٨٩٤ ليشمل جميع العصيات الهوائية السالبة لصبغة كرام والتي تحتوي على أسواط قطبية، نظرًا لأن هذا التعريف كان واسعًا جدًا، تمت إضافة كائنات غير ذات صلة إلى هذا الجنس البكتيري حتى أنه في عام ١٩٨٤، كان هناك أكثر

من ١٠٠ نوع من الزائفة مدرجة في دليل بيرجي لعلم البكتيريا المنهجي (Vos et al., 2011; Diggle and Whiteley, 2020; Goncalves and Vasconcelos, 2021). عندما تم تطوير الأساليب الجزيئية التي تضمنت تسلسل من الحامض النووي الرايبوسومي (16S rRNA, 16 Svedberg) ribosomal ribonucleic acid ومقارنته بين كل هذه الكائنات المجهرية، تمكن العلماء من إعادة تعيين العديد من البكتيريا المصنفة في الأصل على أنها الزائفة إلى أجناس أخرى (Özen and Ussery, 2012). وصنفت البكتيريا بالشكل الآتي وفقاً لما ذكر (Diggle and Whiteley, 2020).

Kingdom: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Class: Gamma Proteobacteria

Order: Pseudomonadales

Family: Pseudomonadaceae

Genus: *Pseudomonas*

Species: *Pseudomonas aeruginosa*

## ٢-٦-٢: وبائية الزائفة الزنجارية (*Pseudomonas aeruginosa*) (Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*)

تُعدُّ *P. aeruginosa* إحدى مسببات الأمراض البشرية الانتهازية التي تسبب الإصابات الحادة والمزمنة لدى الأشخاص الذي يعانون من نقص المناعة (Immunodeficiency)، ومرضى الانسداد الرئوي المزمن (Chronic Obstructive Pulmonary Disorder)، والسرطان (Cancer)، والصدمات (Traumas)، والحروق (Burns)، والإنتان (Sepsis) (Del Mar Cendra and Torrents, 2021; Jurado-Martín et al., 2021). إذ تمثل هذه البكتيريا سبباً رئيساً للإصابات المكتسبة من المستشفيات في جميع أنحاء العالم بسبب امتلاكها مجموعة من عوامل الضراوة التي تتغلب على آليات دفاع المضيف، مما قد تؤدي إلى إتلاف أنسجة المضيف بشكل مباشر عن طريق آليات المقاومة المتأصلة



والمكتسبة للمضادات الحيوية (Sathe et al., 2023). تشير التقديرات إلى أن بكتيريا *P.aeruginosa* في الولايات المتحدة مسؤولة عن أكثر من ٥١٠٠٠ إصابة مرتبطة بالرعاية الصحية وحوالي ٤٤٠ حالة وفاة سنويًا (Weiner et al., 2016).

كشفت الدراسات الوبائية في إسبانيا أن بكتيريا *P. aeruginosa* هي السبب الأكثر شيوعًا للإصابات المكتسبة في المستشفيات إذ تمثل ١٠,٥% من حالات الإصابات البكتيرية المعزولة سريريًا (López-Calleja et al., 2019)، وهي أيضًا رابع أكثر مسببات الأمراض شيوعًا في المستشفيات الأوروبية، وبالمثل في الولايات المتحدة فإن ٧,١% من الالتهابات الحادة للجهاز التنفسي تسببها هذه البكتيريا (McCarthy and Paterson, 2017). بالإضافة إلى ذلك، فقد أفاد المركز الأوروبي للوقاية من الأمراض ومكافحتها لعام (٢٠١٦) أن بكتيريا الزائفة الزنجارية تسبب مجموعة متنوعة من الأصابات المكتسبة في وحدات العناية المركزة في المستشفيات، بما في ذلك الالتهابات الرئوية والتهابات المسالك البولية والتهابات مجرى الدم (Botelho et al., 2019; Haque et al., 2018; Xin et al., 2018). فضلاً عن ذلك، حددت البيانات الصينية لمراقبة مضادات الميكروبات أن 301,917 سلالة مسببة للأمراض معزولة سريريًا وبلغت بكتيريا *P. aeruginosa* نسبة ٧,٩٦% (Feng et al., 2017).

من ناحية أخرى، تسبب هذه البكتيريا التهابًا مزمنًا في قناة الأذن الخارجية والأذن الوسطى وتجفيف الخشاء مما يؤدي إلى إفرازات الأذن المتكررة، أو فقدان السمع من خلال ثقب غشاء الطبلة، وقد أشارت الدراسات أن بكتيريا *P. aeruginosa* هي واحدة من أكثر المسببات الرئيسية لالتهاب الأذن الوسطى الفيجي المزمن في الهند (٣٢,١%)، وهناك أكثر من ٧٠٠ مليون حالة من حالات التهاب الأذن سنويًا على مستوى العالم، حيث وجد أن الأطفال دون سن الخامسة أكثر عرضة للإصابة ببكتيريا *P. aeruginosa*. بشكل عام، لا تمثل هذه البكتيريا تهديدًا محليًا فحسب بل تهديدًا عالميًا كبيرًا على صحة الإنسان (Juyal et al., 2017; Sahu et al., 2019).

### ٣-٦-٢: إمرضية الزائفة الزنجارية (*Pathogenicity of Pseudomonas aeruginosa*)

يمكن عزل بكتيريا *P. aeruginosa* من معظم البيئات، بما في ذلك التربة والنباتات وأنسجة الثدييات (Crone et al., 2020). تتمكن هذه البكتيريا من العيش على الأسطح المختلفة والأجهزة الطبية وهي من مسببات الأمراض الانتهازية التي تسبب العديد من حالات الإصابة لدى البشر (Shariati et al., 2018)،

وقد أصبحت سبباً مهماً للعدوى المكتسبة من المستشفيات ومقاومة المضادات الحيوية ويمكن تحديد هذه البكتيريا كواحدة من أنواع البكتيريا الانتهازية المرتبطة بالعدوى المكتسبة، بما في ذلك ، التهابات المسالك البولية، والتهابات الجروح ، والتهاب القرنية والتهاب الأذن الوسطى ( Kalluf et al., 2017; Ito et al., 2021).

يتمّ تعزيز القدرة الإراضية لبكتيريا *P. aeruginosa* بوساطة العديد من عوامل الضراوة، وبعضها جزء لا يتجزأ من بنية الخلية من ناحية أخرى، يتمّ إنتاج العديد من عوامل الضراوة الإضافية وإفرازها، اعتماداً على البيئة المحيطة بالعامل الممرض ، ومن أهم خصائص بكتيريا *P. aeruginosa* هو قدرتها على التكيف مع البيئات الطبيعية المتنوعة والقاسية (في الجسم الحي)، والتي تتفق مع التنوع الأيضي العالي بين أنواع هذا الجنس (Azuama et al., 2020; Shaw and Wuest, 2020).

تمرّ عملية الإصابة الكاملة ببكتيريا *P. aeruginosa* بثلاث مراحل متميزة الأولى هي الالتصاق البكتيري والاستعمار، تليها مرحلة الغزو الموضعي، وأخرها المرض الجهازى المنتشر. أن عملية المرض قد تتوقف في أي مرحلة بعد مرحلة الاستعمار الأولية، التي يتم ضمانها في الغالب عن طريق عوامل الضراوة المرتبطة بالخلايا، قد تتطور الإصابة إما إلى إصابة حادة أو إصابة مزمنة. تتميز بكتيريا *P. aeruginosa* المسببة للإصابة الحادة بالإنتاج العالي لعوامل الضراوة خارج الخلية، وأما هذه البكتيريا التي تسبب الإصابة المزمنة تنتج كميات قليلة من هذه العوامل (Todar, 2009).

٧-٢: عوامل ضراوة الزانفة الزنجارية (*Virulence factors of Pseudomonas aeruginosa*)

١-٧-٢: الأصباغ (Pigments)

يتمّ تعزيز التعبير عن عوامل الضراوة في بكتيريا *P. aeruginosa* عن طريق تخليق الأصباغ القابلة للذوبان مثل البايوروبين pyorubin (الأحمر)، والبايوميلانين Pyomelanin (البنّي) والبايوفيردين Pyoverdine (الأصفر) (Numan et al., 2018; Celedón and Díaz, 2021). وأهمها الصبغة الخضراء المزرقّة Pyocyanin (البايوسيانين) والتي تظهر على سطح الاطباق المزروعة ويشار إليها بالقيح الأزرق. يتم إنتاج البايوسيانين بنسبة (٩٠-٩٥) % من سلالات هذه البكتيريا (Abdelaziz et al., 2023) ، وهو عبارة عن مركب عطري يحتوي على النيتروجين ينتمي إلى فئة مركبات الفينازين ثلاثية

الحلقات يحتوي على مجموعة الفينول، مما يعطيها خصائص حامضية ضعيفة عند الرقم الهيدروجيني الفسيولوجي، وقد تمّ الكشف عن مستويات كبيرة من البايوسيانين في إفرازات الأذن (حتى ٢,٧ مايكرومولر) بعد الإصابة المزمنة بوساطة *P. aeruginosa*. تشير هذه القيم إلى الأهمية المحتملة لعامل الضراوة هذا في الفيسولوجيا المرضية (Reimer, 2000). ويشارك البايوسيانين في مجموعة متنوعة من الأنشطة البيولوجية مثل تكوين الأغشية الحيوية كما يحفز إنتاج بيروكسيد الهيدروجين  $H_2O_2$  وبالتالي تؤدي إلى موت الخلايا في المضيف (الثدييات) والخلايا الفطرية والبكتيرية المنافسة وبقاء *P. aeruginosa* في ظل ظروف نقص الأوكسجين. فضلاً عن ذلك، يرتبط البايوسيانين بامتصاص الحديد حتى في ظروف انخفاض الأوكسجين كذلك يتحكم البايوسيانين في الجينات المشاركة في تكوين مضخات التدفق (Efflux pump) (Muller and Merrett, 2014; Mudaliar and Bharath Prasad, 2024). بالإضافة إلى ذلك، فإن السلالات المنتجة للبايوسيانين كانت أكثر ضراوة وأكثر مقاومة للعديد من الأدوية من السلالات غير المنتجة للبايوسيانين (Finlayson and Brown, 2011).

#### ٢-٧-٢: الإنزيمات الحالة للدم (Hemolysin)

تعدّ الإنزيمات الحالة للدم سمًا خلويًا يتمّ إنتاجه من قبل البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام عن طريق تكوين ثقب في الغشاء البلازمي لخلايا الدم الحمراء، ويعتقد أن الهيمولايسين هو المسؤول عن العديد من الأحداث المختلفة في الخلية المضيفة، بسبب تحلل خلايا الدم الحمراء، مما يسمح للبكتيريا بامتصاص الحديد الحر. يسبب الهيمولايسين تلف الأنسجة، وإطلاق العناصر الغذائية لخلية المضيف، مما يسهل تكاثر البكتيريا، وقد يعدل أيضًا مسارات إشارات المضيف (Host signaling pathways) التي تؤثر على العديد من العمليات، بما في ذلك بقاء خلية المضيف، والاستجابات الالتهابية، وديناميكية الهيكل الخلوي (Reda et al., 2017). هناك أربعة أشكال من هذا السم، وهي ألفا وبيتا وكاما وديلتا، السم الخلوي الأبرز الذي تنتجه معظم بكتيريا *P. aeruginosa* هو  $\beta$ -Hemolysin الذي يسبب انحلال كامل لخلايا الدم الحمراء، إذا يؤثر بشكل كبير على وظيفة الخلايا المناعية البشرية (Divyakolu et al., 2019; Hatite Al-Daraghi and Abdulkadhim Al-Badrwi, 2020).

#### ٣-٧-٢: إنتاج إنزيم البروتياز (Protease production)

البروتياز عبارة عن إنزيم يعمل على تحلل الروابط الببتيدية وبالتالي يمكنه ان يحلل أو يجزئ الببتيدات، تنتج بكتيريا *P. aeruginosa* العديد من الإنزيمات الحالة للبروتين خارج الخلية والتي تم تحديدها كعوامل

ضراوة تشمل البروتياز القلوي (Alkaline protease)، والبروتياز الرابع (protease IV)، واثنين من الإيلاستاز هما (ElastaseA) (LasA)، (ElastaseB) (LasB). بشكل عام، تلعب هذه الإنزيمات أدوارًا فسيولوجية ووظائف مهمة في المراحل المختلفة من التفاعل بين البكتيريا والمضيف ويمكن أن يحلل مجموعة متنوعة من البروتينات، بما في ذلك البروتينات في المصفوفة خارج الخلية (Extracellular matrix)، وجزيئات الدفاع البروتينية الموجودة في العديد من الخلايا والأنسجة وسوائل المضيف، إن مشاركة إفرازات أنزيمي البروتياز واللايباز (الإنزيم الحال للدهون) خارج الخلية في البكتيريا المكونة للأغشية الحيوية يساعد على زيادة القدرة الوظيفية للعامل الممرض لغزو خلايا المضيف. وتحطيم دفاعات المضيف مما يؤدي إلى تلف الأنسجة (Hoge et al., 2010; Galdino et al., 2017).

### ٢-٧-٤: الأهداب (Type IV Pili)

عبارة عن زوائد خيطية مرنة قابلة للسحب موجودة على سطح الخلية البكتيرية، وتمثل تراكيب أساسية لبدء عملية الإصابة من خلال الدور الذي تلعبه في عمليتي الحركة والالتصاق (Jacobsen et al., 2020)، تتحكم الأهداب في عملية تعرف بحركة الوخز (Twitching motility)، تستخدم هذه الآلية للاستعمار السريع للأسطح المختلفة والتي تولد القوة لدفع الخلية إلى الإمام، نظرًا لخصائصها اللاصقة والحركية، وتلعب دورًا في تطوير الأغشية الحيوية وتجميعها وتكوين هياكل غطاء الأغشية الحيوية الشبيهة بالمشروم، وأخيرًا تمنح الأهداب بكتيريا *P. aeruginosa* القدرة على مقاومة أحدى الآليات المهمة في عملية البلعمة (Tan et al., 2014; Tolker-Nielsen, 2014) وتنشيط الجسيم الالتهابي (inflammasome)، إذ تمثل عملية تنشيط هذا المعقد في البروتينات الخلوية، خطوة التهابية استهلاكية في تنشيط آليات الاستجابة الالتهابية وموت الخلايا التابعة لجهاز المناعة الذاتية (Ketelut-Carneiro and Fitzgerald, 2020).

### ٢-٧-٥: الأسواط (The flagella)

تعدّ الأسواط زوائد حلزونية قابلة للدوران تقع على سطح الخلية البكتيرية، وتمكن البكتيريا من الحركة في الأوساط السائلة على الأسطح شبه الصلبة. الأسواط الموجودة في الزائفة الزنجارية تقع في قطب الخلية ولذلك تسمى الأسواط القطبية (Polar flagella). في معظم الحالات، يكون السوط القطبي منفردًا، لكن بعض أنواع هذه البكتيريا يمكن أن تمتلك ما يصل إلى سبعة أسواط قطبية (Bouteiller et al., 2021)،

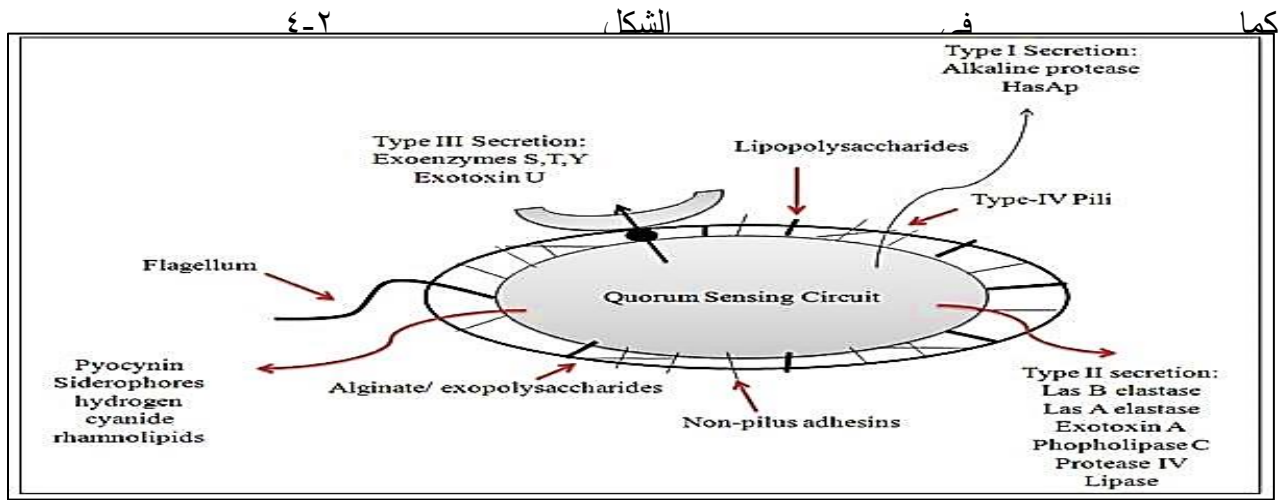
تمكن هذه الزوائد للبكتيريا بالتحرك نحو ظروف أكثر ملائمة أو الهروب من بيئة ضارة. تسمح هذه الحركة للبكتيريا من استعمار العديد من البيئات المتنوعة (Bergeau *et al.*, 2019; Kojima *et al.*, 2020) ، تستهلك عملية البناء الحيوي للأسواط ووظيفة الحركة فيها جزء من الطاقة الكلية للخلية البكتيرية. ويتم تنسيقه مع العمليات الخلوية الأخرى، مثل تكوين الأغشية الحيوية، والضرارة، والحالة الفسيولوجية. وأكدت دراسات متعددة وجود علاقة بين الحركة السوطية وتكوين الغشاء الحيوي وتشتته إذ تعدّ خطوة الالتصاق حاسمة لتكوين الأغشية الحيوية على سبيل المثال، في بكتيريا *P. aeruginosa* ، يكون بروتين FlhD الموجود في الأسواط ضروريًا لالتصاق الميوسين. وتوفر الطاقة خلال خطوات تكوين الأغشية الحيوية الأخرى عن طريق تقليل تنظيم التعبير عن السوط للحفاظ على الطاقة وأدامة الالتصاق، وبالتالي قد يعمل السوط أيضًا بشكل مباشر كجهاز استشعار. على سبيل المثال، يمكنه اكتشاف قرب السطح عن طريق الدوران البطيء، مما قد يؤدي بعد ذلك إلى تحول في نمط الحياة البكتيرية نحو وضع يشبه الغشاء الحيوي (Belas, Diepold and Armitage, 2015 ; 2014) .

#### ٦-٧-٢: عديد السكاريد الدهني (Lipopolysaccharide)

عديد السكاريد الدهني (LPS) هو معقدٌ يشكل جزءًا من الغشاء الخارجي في بكتيريا *P. aeruginosa* وغيرها من البكتيريا السالبة لصبغة كرام، يلعب هذا الجزيء دورًا في الأستزداد، والاستجابة الالتهابية، واستبعاد الجزيئات الخارجية وفي التفاعلات التي تتوسط عملية التعرض لتأثير المضادات الحيوية، ويعمل أيضًا على سلامة هيكلية الأغشية الحيوية ، ويساهم عديد السكاريد الدهني في وظيفة الأغشية الحيوية وهندستها من خلال التأثير على الالتصاق البكتيري والتماسك بين الخلايا والخصائص اللزجة المرنة للأغشية الحيوية، يتكون عديد السكاريد الدهني في بكتيريا *P. aeruginosa* من دهون مثبتة على الغشاء (lipid A)، ومنطقة أساسية قليلة السكاريد Core oligosaccharide ، مستضد نوع O (O antigen). على الرغم من أن LPS هو عامل بارز في التوسط في كل من التسبب في الأمراض البكتيرية واستجابة مناعة المضيف، فإن هذا التأثير يختلف اعتمادًا على مناعة المريض (Kagan, 2017; Huszczyński *et al.*, 2019; Sperandio *et al.*, 2019).

#### ٧-٧-٢: استشعار النصاب (Quorum Sensing ,QS)

هو آلية تنظيمية عامة تستخدمها العديد من البكتيريا لاستشعار عوامل متنوعة، والاستجابة لها مثل تغير كثافة المجتمع الميكروبي، والتعبير عن جينات محددة، وهي تتألف من جزيئات إشارة غشائية صغيرة وقابلة للانتشار بين الخلايا، تسمى محفزات ذاتية (Autoinducers)، يتم إطلاقها في البيئة وتلعب دوراً مهماً في تنظيم التعبير عن العديد من عوامل الضراوة مثل البروتينيز وتكوين الأغشية الحيوية. وهو أمرٌ بالغ الأهمية للاستعمار والإصابة، وينظم آليات متنوعة مثل تكوين الأغشية الحيوية ومقاومة مضادات الميكروبات، يتم ربط الاختلافات في ضراوة بكتيريا *P. aeruginosa* والانتقال من الإصابة الحادة إلى المزمرة بالتغيرات في مستويات المحفز الذاتي وفي التعبير عن الجينات التي تنظمها آلية استشعار النصاب QS. تستخدم البكتيريا المسببة للأمراض هذه الآلية ليس فقط لتعديل إنتاج عامل الضراوة ولكن أيضاً للتكيف مع المتطلبات الأيضية للعيش في البيئات المتنوعة (Lee and Zhang, 2015 ; Brindhadevi et al., 2020)



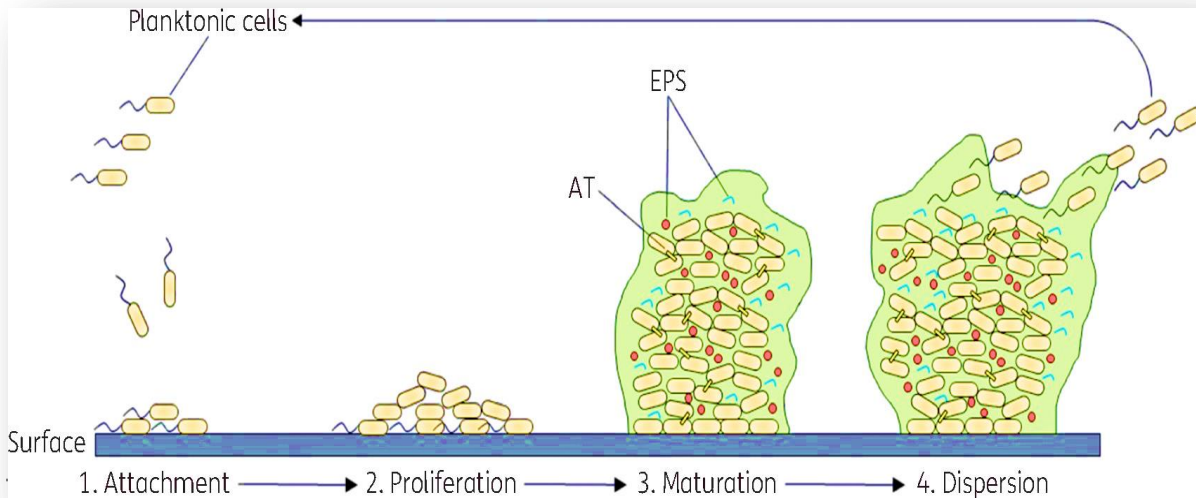
الشكل ٤-٢: رسم تخطيطي لبعض عوامل الضراوة في بكتيريا *P. aeruginosa* (Bhardwaj et al., 2021)

### ٨-٧-٢: تكوين الأغشية الحيوية (Biofilm formation)

يمكن تعريف الأغشية الحيوية على أنها تجمعات ميكروبية تحتوي على مستعمرات بكتيرية مختلفة، أو نوع واحد من الخلايا البكتيرية التي تعيش في ارتباط وثيق عن طريق تغليف نفسها في مصفوفة خارج الخلية (Extracellular matrix) مكونة من الأحماض النووية والدهون والسكريات والبروتينات (Vetrivel et al., 2021) ومواد بوليمرية خارج خلوية (Extracellular Polymeric Substances EPS) ، ملتصقة بطبقة أساسية أو ببعضها البعض. هذه المواد تظهر أنماطاً متغايرة

ظاهرياً ، وتلعب دوراً حاسماً في تطور الأغشية الحيوية حيث أنها تشمل جميع العناصر التي تشكل ٩٠% من إجمالي المادة العضوية الموجودة في مادة المصفوفة، وهي السمة الهيكلية الأكثر أهمية للأغشية الحيوية البكتيرية والتي تسهل الالتصاق بالأسطح (Cao et al., 2019). إن نمو البكتيريا داخل الأغشية الحيوية هو ظاهرة تحدث بشكل طبيعي ، حيث يمكن للكائن المجهرى بأكمله أن يلتصق بشكل حيوي بموقع الإصابة وتعدّ قدرة البكتيريا على استعمار البيئة والنضج كأغشية حيوية على السطح واحدة من استراتيجيات البقاء للكائنات الحية الدقيقة المكونة للأغشية الحيوية (Sharma et al., 2019) بشكل عام، توجد الكائنات الحية الدقيقة كمجموعات منظمة تنمو على أسطح متنوعة ، لتشكل مرحلة نمو متميزة مقارنة بالخلايا الهائمة التي تسبح بحرية، ويُعدّ تكوين الأغشية الحيوية ظاهرة معقدة ودورية تتضمن النقل ، والانتشار، والتفاعل الكيميائي ، والآليات البيئية، ويتمّ التحكم فيه من خلال آليات تشمل النقل والالتصاق، واستشعار النصاب، والانفصال، وموت الخلايا، والتشتت وبالتالي، تُعدّ الأغشية الحيوية بمثابة منظمات هيكلية للكائنات الحية الدقيقة التي تتطور باستمرار لتتكيف مع محيطها (Olivares et al., 2020).

يمكن إنشاء الأغشية الحيوية البكتيرية بشكل جيد في غضون ساعات قليلة، حيث يمر تكوين الأغشية الحيوية بأربع مراحل رئيسية (Jamal et al., 2018). الأولى هي الارتباط الأولي للبكتيريا الهائمة بالسطح عن طريق ملحقاتها خارج الخلية، مثل الأسواط والأهداب حيث يحدث الارتباط بين الخلية البكتيرية والسطح بمجرد ملامسة البكتيريا لسطح المادة تليها مرحلة الالتصاق (Adhesion)، إذ تلتصق الخلايا بالسطح بشكل غير عكسي، وتغلف نفسها في مصفوفة من مواد بوليمرية خارج خلوية مما يؤدي إلى تجميع الخلايا، ويسمح هذا الاتصال بين الخلايا في الأغشية الحيوية للبكتيريا باكتساب وظائف محددة. المرحلة الثالثة هي مرحلة نضوج الأغشية الحيوية عن طريق تكوين مستعمرات صغيرة لتشكل بنية ثلاثية الأبعاد للأغشية الحيوية الناضجة تماماً، آخر مراحل تكوين الأغشية الحيوية هي إطلاق المستعمرات الدقيقة للخلايا من الأغشية الحيوية الناضجة لاستعمار موقع الارتباط الجديد لنشر العدوى وتعدّ هذه المرحلة حرجة لأن الخلايا المنفصلة

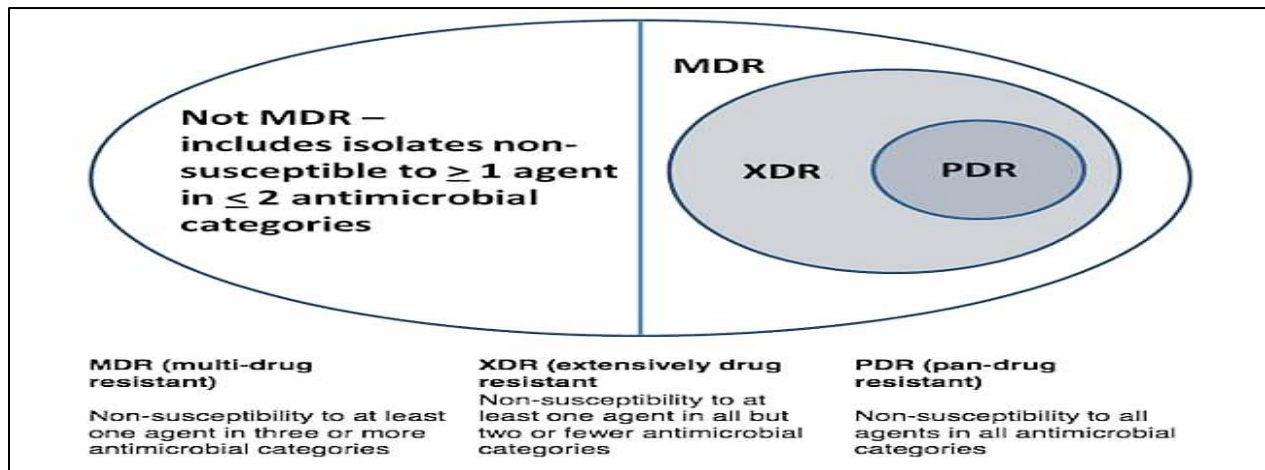


(الهائمة) قد تبدأ دورة جديدة من تكوين الأغشية الحيوية، كما في الشكل ٢-٥.

## ٨-٢: مقاومة المضادات الحيوية في بكتيريا الزانفة الزنجارية (Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*)

وفقاً لمنظمة الصحة العالمية، فإن مقاومة مضادات الإحياء المجهرية (Antimicrobial resistance) هي ظاهرة طبيعية تحدث عندما لا تستجيب الكائنات الحية الدقيقة للمضادات الحيوية التي كانت حساسة لها سابقاً والتي كانت نشطة سابقاً في علاج الإصابات التي تسببها هذه الكائنات الحية الدقيقة (WHO, 2019).

يمكن أن تكون مقاومة بكتيريا *P. aeruginosa* للأدوية المتعددة (Multidrug-Resistant , MDR)، أو مقاومة للأدوية على نطاق واسع (Extensively drug-resistant , XDR)، أو مقاومة شاملة للأدوية (Pan Drug-Resistant , PDR) تشير المقاومة للأدوية المتعددة (MDR) إلى عزلة غير حساسة لعامل واحد على الأقل في ثلاث فئات مضادة للميكروبات. بينما تشير المقاومة للأدوية على نطاق واسع (XDR) إلى عزلة غير حساسة لعامل واحد على الأقل في جميع فئات مضادات الميكروبات باستثناء اثنتين أو أقل (Sweeney et al., 2018). تشير المقاومة الشاملة للأدوية (PDR) إلى عزلة غير حساسة لجميع العوامل في جميع فئات مضادات الميكروبات (Gajdács et al., 2020) (الشكل ٢-٦)، إذ تؤدي المقاومة المتزايدة في بكتيريا *P. aeruginosa* للعديد من المضادات الحيوية، بسبب الإفراط في تناول المضادات الحيوية، إلى تراكم مقاومة المضادات الحيوية وظهور أشكال مقاومة للأدوية المتعددة في بكتيريا *P. aeruginosa* (Langendonk et al., 2021).





الشكل ٢-٦: أنماط مقاومة المضادات الحيوية في بكتيريا *P. aeruginosa* (Magiorakos et al., 2012)

تم إدراج بكتيريا *P. aeruginosa* المقاومة للكاربابينيمات والسيفالوسبورينات من الجيل الثالث كأحد مسببات الأمراض ذات الأولوية الحاسمة من قبل منظمة الصحة العالمية (WHO) في عام 2022 نظراً لقدرتها على اكتساب محددات مقاومة المضادات الحيوية Antibiotic resistance بسهولة وزيادة المقاومة للمضادات الحيوية الأكثر استخداماً مثل الكاربابينيم (Carbapenem)، السيفترياكسون (Ceftriaxone)، وقد ارتفعت قدرة بكتيريا *P. aeruginosa* على تحمل تأثير المضادات الحيوية شائعة الاستخدام بشكل كبير على مر السنين (WHO, 2022).

هناك اختلافات واسعة في معدل انتشار مقاومة الادوية المتعددة في بكتيريا *P. aeruginosa* والمعزولة من العينات السريرية في بلدان عربية مختلفة، إذ كان أعلى معدل للانتشار في مصر (٧٥,٦%) وأدنى انتشار في المغرب (٠%)، بينما كان معدل الانتشار في شبه الجزيرة العربية (٧,٣%) وقطر (٨,١%). وكانت دول المشرق العربي (العراق ولبنان وفلسطين والأردن) متباينة مع وجود مقاومة عالية المستوى في لبنان (٦٤,٥%)، الأردن (٥٢,٥%)، وفلسطين (٤٧,٦%) مقارنة بالعراق (12.4% AI) (Rashed et al., 2020) يتزايد انتشار *P. aeruginosa* المقاومة للأدوية المتعددة (MDR)، والمقاومة للأدوية على نطاق واسع (XDR) على مستوى العالم، إذ يتراوح بين (٣٠-١٥)% و (٩-١١,٢)% على التوالي (Horcajada et al., 2019; Al Hamdan et al., 2022; ) (Mohamed et al., 2022).

يمكن أن يحدث تطور المقاومة من خلال جينوم معقد يتضمن العديد من الآليات المتأصلة والمكتسبة، بالإضافة إلى المقاومة التكيفية والتي يمكن أن تتطور إلى مقاومة شديدة للأدوية (Langendonk et al., 2021).

## ١-٨-٢: مقاومة المضادات الحيوية المتأصلة (Intrinsic Antibiotic Resistant)

تشير مقاومة المضادات الحيوية المتأصلة من قبل الأنواع البكتيرية إلى قدرتها الفطرية على تقليل فعالية مضاد حيوي معين من خلال الخصائص التركيبية، أو الوظيفية المتأصلة (Blair et al., 2015; Qin et al., 2022). لقد ثبت أن الزائفة الزنجارية تمتلك مستوى عالٍ من المقاومة المتأصلة لمعظم المضادات

الحيوية من خلال تقييد نفاذية الغشاء الخارجي، وأنظمة التدفق التي تضخ المضادات الحيوية خارج الخلية وإنتاج الأنزيمات المعطلة للمضادات الحيوية مثل  $\beta$ -lactamases (Moradali et al., 2017) ، قد تكون هذه الآليات مسؤولة عن المقاومة البكتيرية تجاه مضادات البيتا لاكتام ( $\beta$ -lactam) والكينولونات (quinolones)، التي تخترق الخلية من خلال قنوات البورينات (Porins) ،وتجاه الأمينوكلايكوسيدات (Aminoglycosides) والبوليميكسينات (Polymyxins) التي يعتمد امتصاصها على التفاعل مع الغشاء الخارجي للبكتيريا (Mohr, 2016; Munita and Arias, 2016).

## ٨-١-١-٢: تقليل نفاذية الغشاء الخارجي (Outer Membrane Permeability)

الغشاء الخارجي للبكتيريا السالبة لصبغة كرام، مثل بكتيريا *P. aeruginosa* ، يعمل كحاجز انتقائي لمنع تغلغل المضادات الحيوية عن طريق طبقة دهنية ثنائية lipid bilayer غير متماثلة مع عديد السكاريد الدهني (lipopolysaccharide, LPS) في الجزء الخارجي والدهون الفوسفاتية (phospholipids) (PLs) في الجزء الداخلي والعديد من بروتينات الغشاء الخارجي الموجودة في الطبقة الدهنية الثنائية أو المرتبطة بها (Choi and Lee, 2019) ، بعض من هذه البروتينات تشكل قنوات مملوءة بالماء (ما يسمى بورينات) التي تسهل انتقال الجزيئات عبر الغشاء الخارجي (Abdel-Sater, 2018) . يمكن أن تخترق مضادات الميكروبات والمواد المغذية الغشاء الخارجي Outer Membrane عبر مسارين مختلفين، من خلال الطبقة الدهنية الثنائية ، أو من خلال البورينات، وقد تستخدم الجزيئات الكارهة للماء في الغالب مسار الدهون، في حين أن الجزيئات المحبة للماء قد تفضل البورينات (Zgurskaya et al., 2015; Choi and Lee, 2019) .

يمكن أن تقلل بكتيريا *P. aeruginosa* من نفاذية الغشاء الخارجي عن طريق السيطرة على عدد البورينات غير المتخصصة non-specific porins الموجودة في الغشاء (Chevalier et al., 2017) . يعد OprF البورين الأكثر انتشارًا في هذه البكتيريا. على الرغم من أنه غير انتقائي، إلا أنه يتصف بكفاءة منخفضة في نشر المضادات الحيوية، نظرًا لأن جزءًا صغيرًا من OprF يمكنه تشكيل قنوات مفتوحة z (Pang et al., 2019). من ناحية أخرى، يشارك OprD أيضًا في امتصاص المضادات الحيوية حيث إنه يحتوي على مواقع الارتباط للكاربابينيمات، والأعداد المنخفضة من هذا البورين تمنح مستوى أساسي من المقاومة لهذه الفئة من المضادات الحيوية (Li et al., 2012). بالإضافة إلى ذلك، فإن OprH هو أصغر بورين في بكتيريا *P. aeruginosa* ، وقد وجد أن الإفراط في التعبير عن OprH

يرتبط بزيادة المقاومة لمضاد البوليمكسنتات polymyxin B والجنتاميسين gentamicin لأنه يؤدي إلى حدوث تحويرات في عديد السكاريد الدهني (Pang et al., 2019).

## ٢-١-٨-٢: مضخات التدفق (Efflux pump)

تُعدُّ مضخات التدفق إحدى أكثر آليات المقاومة شيوعاً بين مجموعة واسعة من البكتيريا المسببة للأمراض وهي عبارة عن بروتينات نقل موضعية في الغشاء الساييتوبلازمي للبكتيريا التي تنقل المادة الكيميائية بشكل فعال عبر الغشاء (Li et al., 2016). تشارك مضخات التدفق في تنظيم البيئة الداخلية عن طريق قذف المواد الضارة، وجزيئات تكوين الأغشية الحيوية، وعوامل الضراوة للبكتيريا. تصنف مضخات التدفق على أنها أولية وثانوية على أساس مصدر الطاقة الذي تستخدمه لضخ المواد الضارة، تعرف مضخات التدفق التي تستمد الطاقة من التحلل المائي لأدينوسين ثلاثي الفوسفات (ATP) لنقل المواد الضارة عبر الغشاء على أنها مضخات التدفق الأولية، في حين يتم تعريف تلك التي تستمد الطاقة من التدرجات الكهروكيميائية التي تشكلها البروتونات أو الأيونات (القوة الدافعة للبروتون) على أنها مضخات التدفق الثانوي (Du et al., 2018). على الرغم من وجود أنواع مختلفة من مضخات التدفق، بحيث يمكن ضخ مضاد حيوي واحد بواسطة عدة مضخات تدفق مختلفة، ويمكن لمضخة تدفق واحدة طرد مواد متنوعة تركيبياً وكيميائياً (Sharma et al., 2019).

يمكن تصنيف مضخات تدفق المضادات إلى ست عائلات مختلفة بناءً على الاختلافات في تركيبها وطاقة الاقتران (Hassan et al., 2015; Kornelsen and Kumar, 2021)

- ❖ Major facilitator superfamily (MFS)
- ❖ ATP-Binding Cassette (ABC) family
- ❖ Small Multidrug Resistance (SMR) family
- ❖ Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE) family
- ❖ Proteobacterial Antimicrobial Compound (PACE) Efflux family
- ❖ Resistance-nodulation-division (RND) family

وُصفت مضخات RND لأول مرة من قبل مجموعتين مختلفتين في *E. coli* و *P. aeruginosa* ، بشكل مستقل في أوائل التسعينيات من القرن الماضي، هذه المضخات تعمل بشكل معقد ثلاثي الأجزاء ويتألف

من بروتين (RND) المكون الغشائي الداخلي (Inner Membrane Component)، وبروتين اندماج الغشاء (Membrane Fusion Protein, MFP)، وبروتين الغشاء الخارجي (Outer Membrane Protein, OMP) (Fernando and Kumar, 2013).

تشارك هذه المضخات بشكل خاص في مقاومة المضادات الحيوية في بكتيريا *P. aeruginosa*، إذ تعبر هذه البكتيريا عن أربع مضخات تدفق نشطة معروفة تنتمي إلى عائلة (RND)، الأولى MexAB-OprM المسؤولة عن تدفق مضادات البيتا لاكتام  $\beta$ -lactam، بما في ذلك الكاربابينيمات، الثانية MexXY-OprM تشارك في المقاومة المتأصلة للأمينوكلايكوسيدات (Gentamicin, Tobramycin)، الثالثة MexCD-OprJ مسؤولة أيضاً عن التخلص من مضادات البيتا لاكتام  $\beta$ -lactam (Amikacin)، والرابعة MexEF-OprN المسؤولة عن ضخ الكينولون ارتبط الإفراط في التعبير عن مضخات التدفق المتعددة بواسطة هذا النوع بمقاومة الأدوية المتعددة (Llanes et al., 2011; Pang et al., 2019).

#### ٢-٨-١-٣: الإنزيمات المعطلة للمضادات الحيوية (Antibiotic Inactivating Enzymes)

تنتج بكتيريا *P. aeruginosa* إنزيمات تعمل على تحطيم أو تعديل المضادات الحيوية كواحدة من الآليات الفعالة الهامة للمقاومة المتأصلة في هذا الكائن الممرض (Tooke et al., 2019). تحتوي العديد من المضادات الحيوية على روابط كيميائية مثل الأميدات والإسترات التي تكون عرضة للتحلل المائي بواسطة الإنزيمات التي تنتجها بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa*، مثل الإنزيمات المحللة للبيتا لاكتام  $\beta$ -lactamases والإنزيمات المحورة للأمينوكلايكوسيدات (Aminoglycoside-modifying enzymes) (Llanes et al., 2013)، وقد وجد أن عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* تنتج إنزيمات بيتا لاكتام واسعة الطيف (extended-spectrum  $\beta$ -lactamases) الذي يمنح درجة عالية من المقاومة لمعظم مضادات البيتا لاكتام ( $\beta$ -lactam)، بما في ذلك البنسلينات (Penicillins) والسيفالوسبورينات (Cephalosporins)، الأزتريونام (Aztreonam) والكاربابينيمات (Carbapenemases) (Lemarié et al., 2020).

#### ٢-٨-٢: مقاومة المضادات الحيوية التكيفية (Adaptive Antibiotic Resistant)

لبكتيريا *P. aeruginosa* القابلية على التكيف مع البيئات المختلفة في المضائف عن طريق إفراز مجموعة متنوعة من عوامل الضراوة، والتي تساهم في نجاح الإصابة والتسبب في المرض، تشير المقاومة

التكيفية إلى بقاء بكتيريا *P. aeruginosa* ونموها بعد تأثير المضادات الحيوية بسبب التغيرات العابرة في التعبير الجيني استجابةً لمحضر بيئي وعندما تختفي الظروف التي تؤدي إلى المقاومة تعود البكتيريا إلى الحالة الحساسة، الآليات الرئيسية للتكيف تتمثل بالمقاومة للمضادات الحيوية في تكوين الأغشية الحيوية Biofilm وتوليد الخلايا الصامدة Persister cells التي تؤدي إلى استمرار الإصابة ( Spalding et al., 2018 ).

هذه المجتمعات البكتيرية في الأغشية الحيوية مسؤولة عن أكثر من ٥٠% من حالات الإصابة في المستشفيات، وهي مقاومة لمعظم مضادات الميكروبات، وذلك لعدة أسباب، منها عدم قدرة هذه المركبات على اختراق مصفوفة الأغشية الحيوية، حجز مضادات الميكروبات داخل تركيب الأغشية الحيوية، الخمول الأيضي (metabolic latency) للبكتيريا الموجودة في الطبقات الداخلية للأغشية الحيوية بسبب ضعف توفر المغذيات والأكسجين، إنشاء أنظمة اتصال بين البكتيريا القائمة على الأغشية الحيوية من خلال التعبير عن المحفز الذاتي، زيادة معدل نقل جينات مقاومة مضادات الميكروبات بين بكتيريا الأغشية الحيوية، ووجود أعداد كبيرة من الخلايا الصامدة .

تعرف هذه الخلايا بأنها مجموعة سكانية فرعية صغيرة من الخلايا الموجودة داخل الغشاء الحيوي والتي تدخل تلقائيًا في حالة غير نشطة، ولا تظهر أي علامات على انقسام الخلايا (Fisher et al., 2017; Vatan et al., 2018). يتوافق هذا النمط الظاهري البكتيري مع البكتيريا غير النشطة أيضًا ، مما يسمح لها بالبقاء عند التعرض لفترات طويلة لجرعات عالية من مضادات الميكروبات (Liu et al., 2021; Scheper et al., 2021).

### ٢-٨-٣: المقاومة المكتسبة (Acquired Antibiotic Resistance)

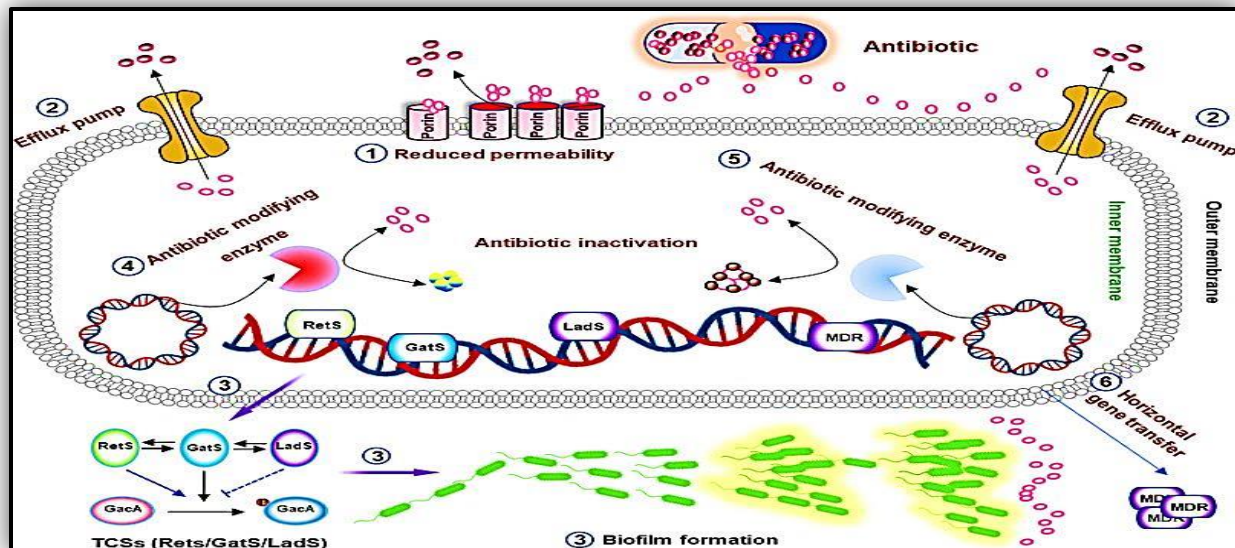
في بكتيريا *P. aeruginosa* تساهم المقاومة المكتسبة بالإضافة إلى المقاومة المتأصلة العالية للمضادات الحيوية ، في تطوير سلالات مقاومة للأدوية المتعددة، مما يزيد من صعوبة القضاء على هذه الكائنات الحية الدقيقة ويؤدي إلى حالات العدوى المستمرة للالتهابات (Paz-Zarza et al., 2019) ، تكتسب بكتيريا *P. aeruginosa* القدرة على مقاومة عمل المضادات الحيوية عن طريق الطفرة التلقائية ، أو اكتساب جينات مقاومة المضادات الحيوية عن طريق النقل الجيني الأفقي ( horizontal gene )

(transfer) للعناصر الوراثية المنتقلة (البلازميدات، العاثيات) من نفس الأنواع البكتيرية أو أنواع مختلفة (Khosravi et al., 2017).

ان إحداث الطفرات أو حدوثها تلقائيًا يمكن أن تكون مسؤولة عن تغييرات دائمة في تركيب جينات البكتيريا إذا كانت سماتها الجديدة مفيدة للبكتيريا وتساهم في بقائها في الظروف الصعبة، فمن المحتمل أن تصبح سائدة عند انتقالها إلى الأجيال اللاحقة، على سبيل المثال أن سلالات الزائفة الزنجارية ذات الطفرات الريبوسومية تطور مستوى عالٍ من المقاومة للأمينوكلايكوسيدات، حيث تمنع مجموعة المضادات الحيوية هذه ترجمة البروتين عن طريق استهداف الوحدة الفرعية للريبوسوم S 30 كما ان الإفراط في التعبير عن أنظمة مضخات التدفق MexAB-OprM سمة مقاومة شائعة مكتسبة في بكتيريا *P. aeruginosa* ، الذي حدث نتيجة لطفرات جينية في منظمات الاستساخ *mexR*، *nalB*، *nalC* و *nalD* ، أدى إلى تعزيز مقاومة البكتيريا لمضادات البيتا لاكتام  $\beta$ -lactam والفلوروكينولونات (Janice et al., 2021; Lorusso et al., 2022).

من ناحية أخرى، تؤدي الطفرة التي تسبب الإفراط في التعبير عن الإنزيمات المعطلة للمضادات الحيوية في بكتيريا *P. aeruginosa* آلية أخرى للمقاومة المكتسبة، كما تحتوي بعض العزلات السريرية لبكتيريا *P. aeruginosa* على إفراط في إنتاج إنزيمات  $\beta$ -lactamases الناجمة عن طفرات في الجين المحفز لإنزيمات  $\beta$ -lactamase و *ampC* ، مما أدى إلى زيادة كبيرة في مقاومة السيفالوسبورينات (Berrazeg et al., 2015; Kakoullis et al., 2021).

تتضمن آليات المقاومة الرئيسية أيضًا نقل الجينات الأفقية عن طريق التنبيغ (Transduction)، التحول (Transformation) والاقتران (Conjugation). وجد الباحثون ان جين *mcr-1* في الإشريكية



القولونية الموجود على البلازميد، هو المسؤول عن مقاومة الكولستين B، ويمكن نقل هذا البلازميد إلى *P. aeruginosa* عن طريق الاقتران (Liu et al., 2016; Li et al., 2020). الشكل ٢-٧ يوضح آليات مقاومة المضادات الحيوية المختلفة في بكتيريا *P. aeruginosa*.

الشكل ٢-٧: آليات الزائفة الزنجارية في مقاومة المضادات الحيوية (Qin et al., 2022)

## ٩-٢: التركيب الجينومي لبكتيريا الزائفة الزنجارية (Genomic structure of *P. aeruginosa*)

تتمتع بكتيريا *P. aeruginosa* بقابلية ملحوظة على التكيف مع مجموعة واسعة من الظروف البيئية المتطرفة، تمتلك هذه البكتيريا جينومًا كبيرًا يبلغ حجمه حوالي ٦,٣ مليون زوج قاعدي ويحتوي على أكثر من ٦٠٠٠ جين مشفر للبروتينات، وتتميز هذه البكتيريا بمرونة جينومية عالية (Davenport, 2011; Silby et al., 2011; Brinkman et al., 2021). تنقسم المادة الوراثية لبكتيريا *P. aeruginosa* إلى الجينوم الأساسي (core genome) (حوالي ٤ مليون زوج قاعدي) والجينوم الإضافي (accessory genome) الذي يتكون بشكل أساسي من عناصر خارج الكروموسومات (extrachromosomal elements) متغايرة في الطول وغير ثابتة وراثيًا مثل البلازميدات، قد تتضمن هذه العناصر المتنقلة جزرًا جينومية (genomic islands)، وهي مسؤولة بشكل كبير عن تنوع هذا الكائن الممرض لأنها تحتوي على جينات مرتبطة بالضراوة وتمنحه القابلية على مقاومة المضادات الحيوية (Brinkman et al., 2021; De Sousa et al., 2021).

يحتوي جينوم بكتيريا *P. aeruginosa* على العديد من الجينات المشاركة في مسارات التمثيل الغذائي، وأنظمة النقل، والحركة. يمكن العثور على المحددات المسؤولة عن خصائص المقاومة المتأصلة لهذا العامل الممرض (أي المرتبطة بمضخات التدفق والإنزيمات المعطلة للمضادات الحيوية) في الجينوم الأساسي، وترتبط أيضًا بتنوعها الأيضي وقابليتها على التكيف (Davenport, 2011; De Sousa et al., 2021; Silby et al., 2011).

## ١٠-٢: جين الرنا الرايبوسومي 16S (16 Svedberg ribosomal ribonucleic acid gene, 16S rRNA)

يُعدُّ جين *16S rRNA* أحد مكونات الوحدة الفرعية الصغيرة 30S من الرايبوسوم في بدائية النواة. يمتد جين الرنا الرايبوسومي *16S rRNA* إلى حوالي ١٥٠٠ زوجًا قاعديًا ويتم تنظيمه في مناطق عالية

الثبات الوراثي تتخللها تسع مناطق متغيرة، إذ تعكس المناطق الثابتة وراثيًا العلاقة التطورية بين الأنواع المختلفة أما المناطق المتغيرة هي التي تعكس الاختلافات بين الأنواع من خلال مقارنة تسلسل جينات الرنا الرايبوسومي 16S rRNA لسلسلة بكتيرية غير معروفة مع تسلسلات معروفة في قواعد البيانات (Abellan-Schneyder et al., 2021; Kim and Chun, 2014) ويُعدُّ أحد أكثر الطرائق شيوعًا التي تستهدف جينات Housekeeping باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) لتضخيم الحامض النووي لسلاسل معينة بشكل انتقائي ، هذا يسمح للباحثين باكتشاف وجود البكتيريا في العينات البيئية، أو العينات السريرية، أو المنتجات الغذائية ،غالبًا ما يتم اختيار البادئات العامة كمكاملة للمناطق الثابتة وراثيًا في بداية الجين أو في نهاية التسلسل بأكمله إذ تحتوي الأنواع البكتيرية المختلفة على نسخة واحدة أو عدة نسخ من هذا الجين ،ومع ذلك فإن الاختلافات بين المناطق الثابتة وراثيًا تحدد الاختلافات في التحام البادئ (Primer annealing) ، التي تؤدي إلى تضخيم الجين اعتمادًا على المنطقة المحددة التي تم استهدافها (Haraoui and Blaser, 2023).

١١-٢: المحددات الجينية لبكتيريا الزائفة الزنجارية في مقاومة المضادات الحيوية (Genetic determinants of *Pseudomonas aeruginosa* in antibiotics resistance)

١-١١-٢: موقع بناء عديد السكاريد (Polysaccharide synthesis locus, psi)

موضع تخليق عديد السكاريد (polysaccharide synthesis locus, Psi) عبارة عن عديد السكاريد الخارجي الغني باللاكتوز والمانوز مع كميات أقل نسبيًا من الكلوكوز والزيلوز . تنتظم مجموعة Psi في أوبرون مكون من ١٥ جين (PsIA-PsIO) منها ١١ جينًا مطلوب لتخليق الأغشية الحيوية والتي تعمل على تعزيز الالتصاق بالأسطح والخلايا الأخرى لبكتيريا *P. aeruginosa*، مما يشير إلى أهميته في الالتصاق، وهو أمر بالغ الأهمية لبدء الحفاظ على بنية الأغشية الحيوية (Yu et al., 2016) . بالإضافة إلى ذلك، وجد أن Psi له دور في التسبب في المرض من خلال زيادة الاتصال بين الخلايا البكتيرية والخلايا الظهارية، وأظهرت الدراسات أن Psi كان له أيضًا دور في مقاومة المضادات الحيوية الكاتيونية (Cationic) والأنيونية (Anionic) خلال المراحل الأولى من تطور الأغشية الحيوية (Billings et al., 2013; Wei and Ma, 2013).

إن الجين الأول في هذا الأوبرون هو جين *psIA* متكون من ٥٩١ زوج قاعدي تشفر بروتين مكون من 478 حامض اميني وزنه الجزيئي ٥٤,٨ كيلو دالتون ، أظهرت الدراسات السابقة دورًا مهمًا لجين



*psIA* في المراحل الأولية لتكوين الأغشية الحيوية بين عزلات *P. aeruginosa* وأن التعبير عن جين *psIA* يستعيد النمط الظاهري لتشكيل الغشاء الحيوي بين السلالات الطافرة ، لذلك، فإنه يشير إلى أن جين *psIA* مطلوب لتكوين الأغشية الحيوية بواسطة *P. aeruginosa* وتم العثور على نتائج لهذا الجين في ٥١٧ جنسًا في كل من السلالات المسببة للأمراض وغير المسببة للأمراض ( Sayers et al., 2022; Stoner et al., 2022). أما المكون الآخر في أوبرون Psl فهو جين *PsID* يشفر لبروتين محيطي يتكون من 256 حامض أميني بوزن جزيئي قدره ٢٧,٩ كيلو دالتون يشارك بتشفير البروتين المطلوب لتصدير عديد السكر يد الخارجي، الذي يعد مكونًا رئيسيًا لمصفوفة الأغشية الحيوية ويُعد هذا الجين هدفًا دوائيًا محتملاً لتطوير مضادات حيوية جديدة من خلال تثبيط وظيفة بروتين *PsID* ( Campisano et al., 2006).

## ٢-١١-٢: جينات الأغشية الحيوية الخاصة بمقاومة المضادات الحيوية (Biofilm-specific antibiotics resistance genes)

### ١-٢-١١-٢: جين *tssC1*

تستطيع الخلايا البكتيرية التواصل مع البيئة المحيطة بها من خلال أنظمة الإفراز. يُعدُّ نظام إفراز النوع السادس T6SS واحدًا من أحدث أنظمة الإفراز الذي يتم توزيعها على نطاق واسع في البكتيريا السالبة لصبغة كرام مثل *P. aeruginosa* ، كما يُعدُّ T6SS مفيدًا لميزة بقاء ونمو بكتيريا *P. aeruginosa* عن طريق حقن العديد من السموم والجزيئات المؤثرة في الخلايا المستهدفة، بما في ذلك البكتيريا الأخرى وحتى مصفوفة الأغشية الحيوية الخاصة بها (Coulthurst, 2019).

جين *tssC1* يشفر لبروتين إفرازي في الزائفة الزنجارية الذي يلعب دورًا في نظام إفراز النوع السادس T6SS، يساهم جين *tssC1* في بكتيريا *P. aeruginosa* بشكل خاص في تغيير بنية الغشاء الحيوي لجعله أقل نفاذية للمضادات الحيوية وإفراز السموم التي تقتل البكتيريا المنافسة، وبالتالي تقليل المنافسة على العناصر الغذائية والسماح للبكتيريا المقاومة بالنمو، كما أنها تتداخل مع قدرة الجهاز المناعي على مكافحة الأغشية الحيوية (Chen et al., 2020).

### ٢-٢-١١-٢: جين *ndvB*

يقوم *ndvB* بتشفير إنزيم الكلوكوسيل ترانسفيراز (*glucosyltransferase*) المشارك في تكوين الكلوكان الحلقي. الكلوكان عبارة عن بوليمرات حلقيّة مكونة من ١٢ إلى ١٥ جزيئة كلوكوز المرتبطة ببعضها البعض برابطة كلايكوسيدية من نوع (1→3)  $\beta$  مع بدائل الفوسفوكليسرول *phosphoglycerol* substitutions، تشكل هذه البوليمرات جزءاً من مصفوفة الأغشية الحيوية التي تؤدي إلى إعاقة تغلغل المضادات الحيوية في الأغشية الحيوية بالإضافة إلى منع هذه المضادات الحيوية من الوصول إلى أهدافها داخل الخلية البكتيرية، يمكن لبعض الكلايكونات الحلقيّة تعطيل نشاط بعض المضادات الحيوية عن طريق تعديلها إنزيمياً، وهذا يمكن أن يقلل من فعالية المضاد الحيوي ويساهم في المقاومة كما إن وجود الكلايكونات الحلقيّة يمكن أن يؤدي إلى تنظيم مضخات التدفق في البكتيريا (Venkatachalam et al., 2013; Ismail and Altaai, 2021).

يتم تنظيم جين *ndvB* على وجه الخصوص في بكتيريا *P. aeruginosa* المكونة للأغشية الحيوية مقارنةً بالخلايا الهائمة وهذا يشير إلى أن جين *ndvB* يلعب دوراً حيوياً في مقاومة المضادات الحيوية المرتبطة بالأغشية الحيوية (Frösler et al., 2017).

### ٣-١١-٢: نظام الضخ نوع MexAB-OprM

تعمل مضخات التدفق على نقل المضادات الحيوية بشكل فعال إلى خارج الخلية، مما يؤدي إلى تقليل تركيزها داخل الخلايا (Chetri, 2023). من بين أنظمة الضخ التي تساهم في المقاومة الطبيعية والمكتسبة للمضادات الحيوية في بكتيريا *P. aeruginosa* هو نظام MexAB-OprM الذي يمثل ناقلات بروتينية تقع في الغشاء الخلوي، وكما يتميز هذا النظام بمعدل عالٍ من التغيرات في سلالات بكتيريا *P. aeruginosa*، تعود هذه الأنظمة إلى عائلة تقسيم العقيدات المقاومة (RND) التي تساهم في المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية، والتي يتم التعبير عنها بشكل أساسي، وبالتالي فهي مساهم مهم في المقاومة المتأصلة في بكتيريا *P. aeruginosa* وكذلك في زيادة المقاومة بسبب الطفرات التنظيمية التي تزيد من تعبير المضخة، مما يقلل من تركيز المضادات المستهدفة دون تعديل في تركيبها مقارنةً بآليات المقاومة الأخرى التي تعمل على تغيير الهدف أو المضاد لتعطيل فعاليته (Tian et al., 2016).

يتكون النظام من ثلاثة أجزاء هي MexB والذي يمثل بروتين الغشاء الداخلي (Inner membrane)، والذي يرتبط ببروتين OprM الموجودة في الغشاء الخارجي (Outer membrane) من خلال بروتين MexA الموجود في الفسحة البلازمية (Periplasmic space) (Schindler and Kaatz, 2016).

، على الرغم من أن جميع البروتينات الثلاثة الموجودة في هذا النظام ضرورية لتدفق الدواء من بكتيريا *P.aeruginosa*، يتم تحديد خصوصية المادة الضارة عن طريق MexB من خلال التعرف على مجموعة واسعة من المركبات المختلفة كيميائيًا بالإضافة إلى دورها الهام في نقل المواد المختلفة وطرحها خارج الخلية للتخلص من تأثيرها الضار بما في ذلك المطهرات (Disinfectants) والمعقمات (Antiseptics) والاصباغ مثل صبغة بروميد الاثيديوم (Ethidium bromide) وصبغة البنفسج البلوري ( Crystal violet) (Venter et al., 2015).

## 2-12: الأهداف الدوائية في الزائفة الزنجارية المنتجة للأغشية الحيوية (Drug targets in biofilm forming *P.aeruginosa*)

تُعد الوقاية من بدء تكوين الأغشية الحيوية أهم خطوة لمكافحة مسببات الأمراض المرتبطة بالأغشية الحيوية، حيث يتم تعزيز قدرة مسببات الأمراض على مقاومة المضادات الحيوية بمقدار 10 إلى 1000 مرة بمجرد تكوين الأغشية الحيوية. تُعد الجينات الأساسية لنمو البكتيريا في الحالة الهائمة (Planktonic state) أهدافًا دوائية (Drug targets) محتملة لعلاج مسببات الأمراض المرتبطة بالأغشية الحيوية (Olsen, 2015).

حددت إحدى الدراسات أربعة جينات أساسية (*lysC*، *cysH*، *adk* و *galu*) والتي تشكل أهدافًا جينية للعلاج. لقد تم اقتراحها من خلال البيانات التجريبية الموجودة كأهداف دوائية محتملة لدورها الحاسم في بقاء أو ضراوة بكتيريا *P. aeruginosa*، إذ إن تطفير أي منهما يمكن أن يقتل الخلايا الهائمة المسببة للأمراض بدون تحفيز عملية التحول من الحالة الهائمة إلى تكوين الأغشية الحيوية، أكدت الأدلة التجريبية المذكورة أيضًا أن هذه الجينات الأربعة هي أهداف جيدة لعلاج بكتيريا *P. aeruginosa* المرتبطة بالأغشية الحيوية (Xu et al., 2013).

يمكن إجابة الأسئلة الطبية الحيوية، مثل العثور على أهداف دوائية جديدة، والبحث عن مؤشرات حيوية أفضل، ودراسة أيض الأمراض البشرية، باستخدام أنظمة الحوسبة البيولوجية Computational biology. تُعد عمليات إعادة البناء الأيضية على نطاق الجينوم بمثابة قواعد بيانات معرفة منظمة جينيًا وكيميويحيويًا. يمكن أن تحول عمليات إعادة البناء الأيضية إلى نماذج حسابية من أجل معالجة المسائل التقنية الحيوية والطبية الحيوية باستخدام أساليب مختلفة، بما في ذلك النمذجة الجزيئية (Molecular modeling)،

بالإضافة الى ذلك حدد Sigurdsson وآخرون العديد من الجينات، كان لحذفها تأثير عام على الشبكة الأيضية، وكان لحذف جين *adk* في *P.aeruginosa* ATCC3686 تأثير على تركيب ٣٠ مادة أولية لها دور في جميع الظروف البيئية (Sigurdsson et al., 2012).

حدد التركيب ثلاثي الأبعاد (Three-dimensional structures) للبروتينات التي تشفر لها ثلاث من الجينات الأساسية المذكورة أعلاه باستثناء البروتين الذي يشفر له جين *adk*.

## 1-12-2: إنزيم الأدينيلات كينيز (Adenylate kinase)

الإنزيم المشفر بواسطة جين *adk* هو أدينيلات كينيز، وهو إنزيم واسع الانتشار يساهم في توازن نيوكليوتيدات الأدينين في الخلايا حقيقية النواة وبدائية النواة والتي تحفز التحويل العكسي المعتمد على المغنيسيوم لـ ATP و AMP إلى جزيئين من ADP (Fujisawa, 2023). على أساس مقارنات التسلسل، يمكن ان ينتظم الأنزيم في مجموعتين تتألف من متغيرات قصيرة (~ ١٩٠ ثمالة حامض أميني) وطويلة (٢١٤-٢٣٨ ثمالة حامض أميني). بدائيات النوى لديها حصراً متغيرات طويلة long variants. من ناحية أخرى، تحتوي حقيقيات النوى على متغيرات Adk قصيرة وطويلة موجودة في الساييتوبلازم والميتوكوندريا، على التوالي. تمَّ تحديد العديد من التراكيب ثلاثية الأبعاد لأنزيم Adk من كل من المجموعات المتغايرة وفئاتها الفرعية، مع أو من دون مادة أساس (Substrate) مرتبطة، وجميعها تشترك في خصائص متماثلة على مستوى التركيب الثلاثي للبروتين (Tertiary structure) التي يمكن تقسيمها إلى ثلاث مناطق فرعية وظيفية (functional subdomains) هي منطقة اللب (core subdomain)، منطقة ارتباط الأدينوسين أحادي الفوسفات (AMP-binding subdomain)، ومنطقة ارتباط الأدينوسين ثلاثي الفوسفات (ATP-binding subdomain (AMP<sub>bd</sub>)). يتكون لب البروتين من صفحة بيتا مركزية متوازية خماسية (-central five-stranded parallel  $\beta$ -sheet) محاطة بعدد من الحلزونات الفا ( $\alpha$ -helix) على محيط منطقة CORE يوجد المجال الفرعي AMP<sub>bd</sub> والجزء الفرعي LID لربط ATP. الاختلاف الرئيسي بين المتغيرين القصير والطويل في أنزيم Adk هو حجم منطقة LID في المتغير الطويل التي تحتوي على ٢٥-

٤٠ ثمالة حامض أميني إضافية . في عملية الحفز، تحدث تغييرات توافقية كبيرة في النطاقين الفرعيين (AMPbd and LID subdomains) عند ارتباط المادة الاساس مع مرونة توافقية بين حالتي الأنزيم المفتوحة والمغلقة (المرتبطة بالمادة الأساس) المرتبطة ارتباطًا وثيقًا بالنشاط الحفزي. نظرًا لأن بروتينات Adk تلعب دورًا مركزيًا في الأيض الخلوي، كما أن هناك اختلافات معنوية في الخصائص الحفزية Catalytic properties بين المتغاير الطويل الموجود في بدائيات النوى والمتغاير القصير الموجود في سايتوبلازم حقيقيات النوى، فإن هناك اهتمامًا بهذا الإنزيم كهدف لأدوية جديدة تستهدف العوامل البكتيرية المرضية (Buchko *et al.*, 2010).

# الفصل الثالث

## المواد وطرائق العمل

## Materials & Methods

٣- المواد وطرائق العمل (Materials and Methods)

1-3 : المواد (Materials)

1-1-3 : الأدوات والأجهزة المختبرية (Equipments and Laboratory apparatus)

الجدول 1-3: الأدوات المختبرية والأجهزة المستخدمة في هذه الدراسة

| الشركة المصنعة - المنشأ | اسم الجهاز / الأداة  | ت   |
|-------------------------|--|-----|
| Jlassco - India         | أسطوانة زجاجية مدرجة (Glass graduated cylinder)                    | .١  |
| Binder - Germany        | الحاضنة (Incubator)  | .٢  |
| Genex - USA             | المؤصدة (Autoclave)  | .٣  |
| Himedia - India         | الناقل الزراعي القياسي (Standard wire loop)                        | .٤  |
| Kotterm -Germany        | ثاقب فلييني (Cork borer)   | .٥  |
| LG - Korea              | ثلاجة (Refrigerator)   | .٦  |
| Germany-Memmert         | حمام مائي (Water bath)   | .٧  |
| BioTek - USA            | جهاز (DensiChek)   | .٨  |
| Biobase - China         | جهاز (Polymerase chain reaction PCR thermal cycler)                | .٩  |
| Optima - Japan          | جهاز الترحيل الكهربائي (Electrophoresis gel system)                | .١٠ |
| Kotterm - Germany       | جهاز التقطير (Water Distiller)                                     | .١١ |
| Hettich - Germany       | جهاز الطرد المركزي (Centrifuge)                                    | .١٢ |
| Eppendorf - Germany     | جهاز الطرد المركزي البارد عالي السرعة (High speed cold centrifuge) | .١٣ |

|                     |                                 |     |
|---------------------|---------------------------------|-----|
| Biomerieux - France | (Vitek 2 compact) جهاز الفايترك | ١٤. |
|---------------------|---------------------------------|-----|



|                        |  |     |
|------------------------|--|-----|
| BioTek - USA           | جهاز قارئ الاليزا (ELISA reader)                         | .١٥ |
| Tuder - Korea          | جهاز قياس الضوء الطيفي ( Spectrophotometer )             | .١٦ |
| Meheco - China         | حامل بلاستيكي (Plastic rack)                             | .١٧ |
| Iwaki glass - Japan    | دورق زجاجي (Glass Beaker)                                | .١٨ |
| BBL - USA              | دورق مخروطي (Conical flask)                              | .١٩ |
| Stuart - England       | صفحة ساخنة (Hot plate)                                   | .٢٠ |
| BioTek - England       | فرن كهربائي (Oven)                                       | .٢١ |
| JeioTech - Korea       | كابينة الزرع المجهرية (Biological safety cabinet)        | .٢٢ |
| Samsung - China        | كاميرا رقمية (Digital camera)                            | .٢٣ |
| Griffin - England      | مازج (Vortex mixer)                                      | .٢٤ |
| Slammed - Germany      | ماصات دقيقة (Micropipette)                               | .٢٥ |
| Gosonic - China        | مايكرويف (Microwave)                                     | .٢٦ |
| Vesta frost - Denmark  | مجمدة (Deep freezer)                                     | .٢٧ |
| Kruss - Germany        | مجهر ضوئي (Light microscope)                             | .٢٨ |
| Jenway - Germany       | مصباح بنزن (Bunsen burner)                               | .٢٩ |
| Major science - Taiwan | مصدر للأشعة فوق البنفسجية (Ultraviolet transilluminator) | .٣٠ |
| Germany - Denver       | ميزان حساس ( Sensitive Balance )                         | .٣١ |

٣-١-٢: المواد ذات الاستعمال الواحد (Disposable materials)

الجدول ٣-٢: المواد ذات الاستعمال الواحد

| الشركة المصنعة - المنشأ | اسم المادة   | ت   |
|-------------------------|--|-----|
| HAD - China             | أبر معقمة (Sterilized needles)                         | .1  |
| Afco-Dipo - Jordan      | أطباق بتري (Petridish)                                 | .2  |
| Afco-Dipo - Jordan      | اطراف الماصة الدقيقة (Micropipette tips)               | .3  |
| Afco-Dipo - Jordan      | أنابيب ايندروف (Eppendorf tube)                        | .4  |
| Afco-Dipo - Jordan      | أنابيب مختبرية ( Plain tube, khan tube )<br>حجم ١٠ مل  | .5  |
| Slamed - Germany        | شرائح مجهرية (Microscope slide)                        | .6  |
| Amies - China           | غطاء شريحة زجاجية (Cover slide)                        | .7  |
| Sail Brand - China      | قطن (Cotton)   | .8  |
| Sartorius- Germany      | قفازات مطاطية (Latex gloves)                           | .9  |
| Sartorius - Germany     | مسحة قطنية مع وسط ناقل (Transport Sterile Medium Swab) | .10 |
| Broche - Malaysia       | مرشحات دقيقة (Millipore filters)                       | .11 |

### ٣-١-٣: الأوساط الزرعية (Culture media)

الجدول ٣-٣: يوضح جميع الأوساط الزرعية المستخدمة في عزل وتشخيص العزلات الجرثومية

| الشركة المصنعة- المنشأ | اسم الوسط   | ت   |
|------------------------|---|-----|
| Himedia – India        | اكار الدم الأساس (Blood agar base)                                | .١  |
| Oxoid – England        | وسط مرق نقيع القلب والدماغ (Brain heart infusion broth)_          | .٢  |
| Oxoid – England        | اكار السابروييد دكستروز Sabouraud dextrose (agar)                 | .٣  |
| Himedia – India        | اكار السترمييد (Cetrimide agar)                                   | .٤  |
| Himedia – India        | الاکار المغذي (Nutrient agar)                                     | .٥  |
| Himedia - India        | اكار اليوريا الأساس (Urea agar base)                              | .٦  |
| Himedia – India        | وسط حليب الفرز الصلب (Skim milk agar medium)                      | .٧  |
| Himedia – India        | وسط اكار سترات السيمون (Simmons citrate agar)                     | .٨  |
| Himedia – India        | وسط اكار الماكونكي (MacConkey agar)                               | .٩  |
| Oxoid – England        | وسط اكار ثلاثي السكر والحديد (Triple sugar iron agar)             | .١٠ |
| Himedia – India        | وسط المرق المغذي (Nutrient broth)                                 | .١١ |
| Oxoid – England        | وسط اكار الجيلاتين (Gelatin)                                      | .١٢ |
| Oxoid – England        | وسط ماء الببتون المغذي (Peptone water agar)                       | .١٣ |
| Himedia – India        | وسط المولر هنتون (Mueller Hinton agar)                            | .١٤ |
| Oxoid – England        | وسط احمر المثيل-فوكس بروسكاور السائل (Methyl Red-Voges Proskauer) | .١٥ |

٣-١-٤ : المواد الكيميائية والصبغات (Chemical materials and Stains)

الجدول ٣-٤ : يوضح المواد الكيميائية،الصبغات والمحاليل المستخدمة في هذه الدراسة

| الشركة المصنعة – المنشأ | اسم المادة   | ت   |
|-------------------------|--|-----|
| BDH - England           | الفانفتول (Alpha-naphthol)                                     | .1  |
| Bioneer - Korea         | الدليل الحجمي (DNA Ladder)<br>(١٥٠٠-١٠٠) زوج قاعدي             | .2  |
| Iraq - مصرف الدم        | بلازما (Plasma)  | .3  |
| BDH - England           | بيروكسيد الهيدروجين (Hydrogen peroxide)                        | .4  |
| BDH - England           | حامض الكبريتيك المركز (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )        | .5  |
| BDH – England           | صبغة احمر المثيل (Methyl red)                                  | .6  |
| Biobasic Inc. - USA     | صبغة بروميد الاثيديوم (Ethidium bromide dye)                   | .7  |
| BDH - England           | كاشف الاوكسيديز (Oxidase reagent)                              | .8  |
| Himedia - India         | كاشف كوفاكس (Kovacs reagent)                                   | .9  |
| BDH - England           | كحول ايثيلي (70%) (Ethanol)                                    | .10 |
| Bioneer - Korea         | كحول الايثانول المطلق (Absolute ethanol 99%)                   | .11 |
| BDH - England           | كلوريد الباريوم المائي (BaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O) | .12 |
| BDH - England           | كلوريد الصوديوم (NaCl)   | .13 |
| BDH - England           | كليسيرول Glycerol  | .14 |

|                     |  |     |
|---------------------|--|-----|
| Add bio - Korea     | ماء منزوع الأيونات (Deionized water)   | .15 |
| Biobasic Inc. - USA | محلول ترحيل الدارئ (Tris- Borate EDTA (TBE) buffer)  | .16 |
| Schuchard - Germany | محاليل صبغة كرام<br>صبغة البنفسج البلوري (Crystal violet Stain)<br>صبغة السفرانين (Safranin Stain)<br>الايودين (Iodine)<br>الكحول الايثيلي ٩٦% | .17 |
| Add bio - Korea     | ماء خالي من النيوكلييز (Nuclease free water)   | .18 |
| BDH - England       | هلام الاكاروز (Agarose)  | .19 |
| BDH - England       | هيدروكسيد البوتاسيوم (Potassium hydroxide)   | .20 |
| CDH - UK            | يوريا (Urea)   | .21 |

٣-١-٥: العُدَد (kits)

الجدول ٣-٥: يبين العُدَد المستعملة في هذه الدراسة

| الشركة المصنعة - المنشأ | المكونات  | العدة  | ت  |
|-------------------------|---|--|----|
| Geneaid -Thailand       | Gram+ Buffer<br>GT Buffer<br>GB Buffer<br>W1 Buffer<br>Wash Buffer <sup>1</sup><br>Lysozyme <sup>2</sup><br>Proteinase K <sup>3</sup><br>GD Columns<br>2ml Collection Tub<br>Elution Buffer | عدة استخلاص الحامض<br>النووي الجينومي<br><br>Genomic DNA<br>extraction kit | .1 |
| Bioneer -Korea          | Taq DNA Polymerase<br>PCR Reaction Buffer<br>dNTPS<br>Gel loading buffer  | Taq PCR Master<br>Mix Kit  | .2 |
| Biomirieux -France      | اشرطة جهاز الفايك<br>VITEK <sup>®</sup> 2 Antimicrobial susceptibility test<br>(AST) cards<br>VITEK <sup>®</sup> 2 identification (ID) cards  |  | .3 |

٦-١-٣: البادئات (Primers)

الجدول ٣-٦: بادئات بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* المجهزة من شركة (Macrogen) الكورية

| المصدر                            | حجم الناتج<br>Amplicon<br>size (pb) | تتابع البادئ (5' → 3')         | اسم الجين |
|-----------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------|
| (Spilker <i>et al.</i> , 2004)    | 956                                 | F<br>GGGGGATCTTCGGACCTCA       | 16srRNA   |
|                                   |                                     | R<br>TCCTTAGAGTGCCCACCCG       |           |
| (Beaudoin <i>et al.</i> , 2012)   | 157                                 | F<br>GGCCTGAACATCTTCTTCACC     | ndvB      |
|                                   |                                     | R<br>GATCTTGCCGACC TTGAAGAC    |           |
| (Zhang <i>et al.</i> , 2011)      | 150                                 | F<br>CTCCAACGACGCGA TCAAGT     | tssC1     |
|                                   |                                     | R<br>TCGGTGTTGTTGAC CAGGTA     |           |
| (Banar <i>et al.</i> , 2016)      | 369                                 | F<br>TGTACACCGTGCTCAACGAC      | PsID      |
|                                   |                                     | R<br>CTTCCGGCCCGATCTTCATC      |           |
| (Pourakbari <i>et al.</i> , 2016) | 244                                 | F<br>GTGTTTCGGCTCGCAGTACTC     | mexB      |
|                                   |                                     | R<br>AACCGTCGGGATTGACCTTG      |           |
| Hou <i>et al.</i> , )<br>(2012)   | 1119                                | F<br>CACTGGACGTCTACTCCGACGATAT | PsIA      |
|                                   |                                     | R<br>GTTTCTTGATCTTGTGCAGGGTGTC |           |

٣-١-٧: المضادات الحيوية (Antibiotics)

الجدول ٣-٧: المضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة

٣-٢: طرائق العمل (Methods)

| الشركة المصنعة - المنشأ | الرمز | المضاد الحيوي                | ت   |
|-------------------------|-------|------------------------------|-----|
| Biomirieux- France      | TC    | Ticarcillin                  | .١  |
|                         | TCC   | Ticarcillin /clavulanic acid | .٢  |
|                         | PIP   | Piperacillin                 | .٣  |
|                         | CAZ   | Ceftazidime                  | .٤  |
|                         | Cfe   | Cefepime                     | .٥  |
|                         | IMI   | Imipenem                     | .٦  |
|                         | MRP   | Meropenem                    | .٧  |
|                         | AK    | Amikacin                     | .٨  |
|                         | GEM   | Gentamicin                   | .٩  |
|                         | TOB   | Tobramycin                   | .١٠ |
|                         | CIP   | Ciprofloxacin                | .١١ |
|                         | CS    | Colistin                     | .١٢ |

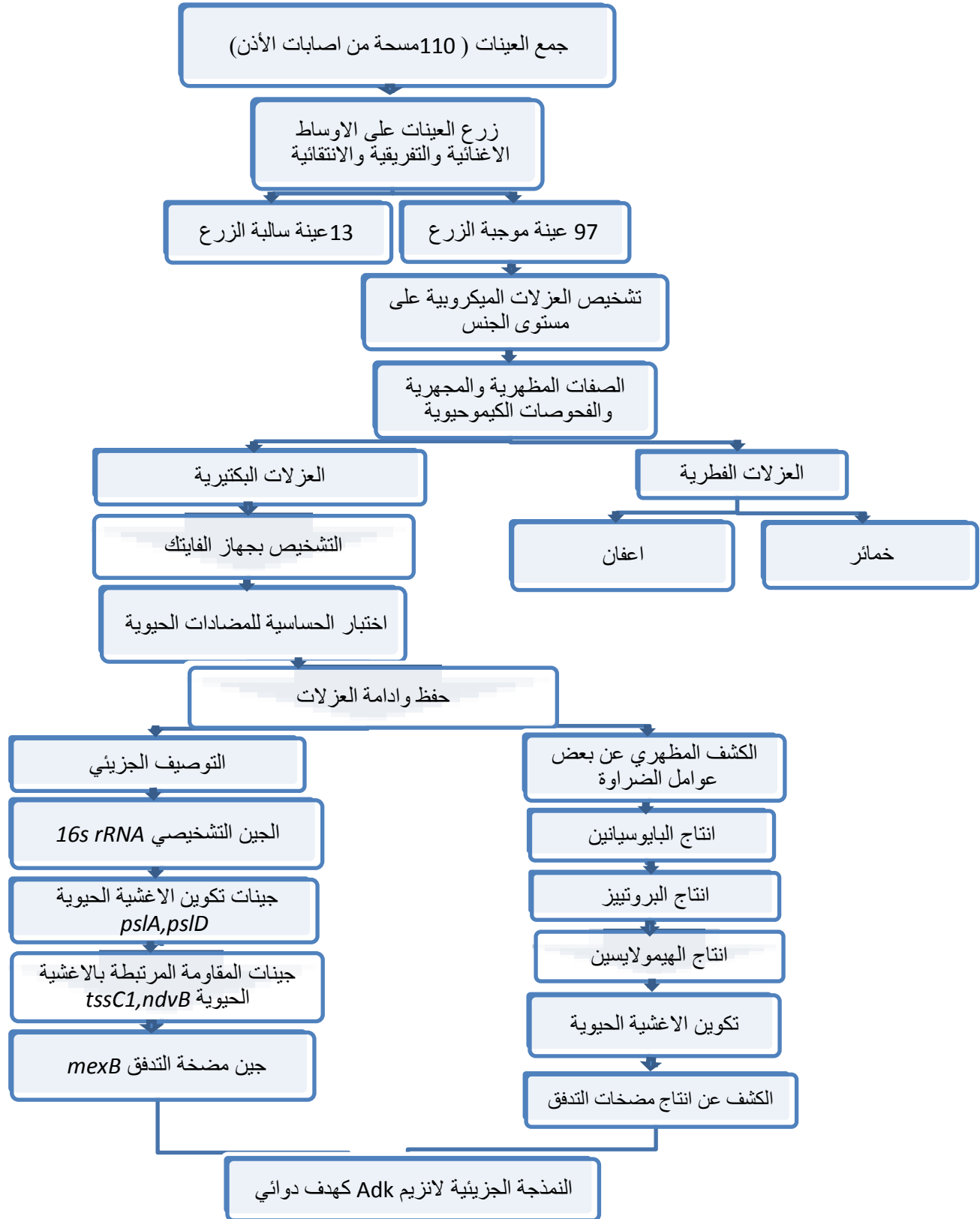
1-2-3: تصميم الدراسة (Study design)

المخطط (1-3) يوضح تصميم الدراسة

٣-٢-٢: جمع العينات (Collection of samples)

تمّ جمع العينات (١١٠ مسحة) باستخدام مسحات قطنية معقمة وتمّ تدويرها بلطف على الجزء المصاب للمرضى المصابين بالتهاب الأذن من المراجعين لاستشارية الأنف والأذن والحنجرة في مدينة الإمام الحسين الطبية، ومن العيادات الخارجية لمناطق مختلفة في محافظة كربلاء المقدسة، وتراوحت أعمارهم من ١-٧٥ سنة للمدة من من آب ٢٠٢٣ إلى تشرين الأول ٢٠٢٣، ونُقلت المسحات مع الوسط الزرعي الناقل (Transport media) إلى مختبر الأحياء المجهرية في مستشفى الإمام الحسين الطبية من أجل زرعها على الأوساط الأغذية مثل وسط اكار الدم الأساس (Blood agar base)، والتفريقية كوسط الماكونكي (MacConkey agar) والانتقائية مثل وسط السترماید (Cetrimide agar) بالإضافة إلى وسط السابرويد دكستروز الصلب (Sabouraud dextrose agar)، وحُضنت عند درجة حرارة (٣٠-٣٧)°م و (٣-٥) أيام لمدة ٢٤ ساعة لكل من البكتيريا والفطريات على التوالي، لغرض تنميتها وإجراء الفحوصات المجهرية والكيموحيوية.





الشكل 3-1: تصميم الدراسة

**3-2-3: التعقيم (Sterilization)**

عُقدت جميع الأوساط الزرعية المستخدمة في الدراسة، والتي لا تتأثر بالحرارة باستخدام جهاز المؤصدة (Autoclave) بدرجة حرارة ١٢١ م° وضغط ١٥ باوند/ أنج<sup>٢</sup> لمدة ١٥ دقيقة، بينما عُقدت المواد الأخرى مثل الأدوات الزجاجية في الفرن الكهربائي (Oven) عند درجة حرارة ١٦٠ م° لمدة ساعتين، واستخدمت المرشحات الدقيقة (Millipore filters) بقطر ٠,٢٢ مايكروليتر لتعقيم المحاليل التي تتأثر بالحرارة (Li et al., 2023).

**3-2-4: تحضير الأوساط الزرعية (Preparation of Culture Media)****3-2-4-1: الأوساط الزرعية الجاهزة (Ready Made Media)****3-2-4-1-1: وسط اكار الماكونكي (MacConkey agar)**

حُضِرَ هذا الوسط وفق تعليمات الشركة المجهزة من خلال إذابة ٥١,٥ غم من مسحوق الوسط في لتر من الماء المقطر وعقم بالمؤصدة، ثم ترك ليبرد إلى درجة حرارة ٤٥-٥٠ م°، وصب في أطباق معقمة واستخدم كوسط تفريقي لعزل البكتيريا السالبة لصبغة كرام وتشخيصها من حيث قابليتها على تخمير سكر اللاكتوز (Supriatin et al., 2021).

**3-2-4-2: وسط الاكار المغذي (Nutrient agar)**

حُضِرَ الوسط المغذي بناءً على تعليمات الشركة المنتجة، وذلك بإذابة ٢٨ غم من مسحوق الوسط في لتر من الماء المقطر وبعد تعقيمه بالمؤصدة، ترك ليبرد إلى درجة حرارة تتراوح بين ٤٥-٥٠ م° بعد ذلك وضَع الوسط في أطباق معقمة، استخدم في تنمية وحفظ العزلات البكتيرية واختبار قابليتها على الحركة (Kumbhare, 2023).

**3-2-4-3: وسط المرق المغذي (Nutrient broth)**

أذيب ١٣ غم من مسحوق الوسط في لتر من الماء المقطر، وبعدما عُقد بالمؤصدة، تُرك ليبرد إلى درجة حرارة تتراوح بين ٤٥-٥٠ م° بعد ذلك، سُكب في أنابيب معقمة واستخدم في تنمية العزلات البكتيرية (Harrigan and McCance, 2014).

**3-2-4-4: وسط اكار السترميد (Cetrimide agar)**

أعدَّ الوسط الانتقائي لأجناس بكتيريا *Pseudomonas* بوساطة إذابة ٤٦,٧ غم من المسحوق في لتر من الماء المقطر، ثم عُقم بالمؤصدة ، وُبُرِّد ووزَّع في أطباق معقمة (Pedro Peek et al., 2018).

### ٣-٢-٤-١-5: وسط السابرويد دكستروز (Sabouraud dextrose agar)

لتنمية العزلات الفطرية ، جَهِّز هذا الوسط عن طريق إذابة ٦٥ غم من الوسط في لتر من الماء المقطر ثم عقم بالمؤصدة ، وُبُرِّد إلى درجة حرارة (٤٥-٥٠ م°) ووضَّع في أطباق معقمة وحفظ في الثلاجة لحين الاستخدام (Jabber, 2023).

### ٣-٢-٤-١-6: وسط مولر هنتون (Mueller Hinton agar)

جَهِّز هذا الوسط تبعاً لتعليمات الشركة المصنعة من خلال إذابة ٣٨ غم من مسحوق الوسط في لتر من الماء المقطر، وعقم بالمؤصدة، وبعدها بُرِّد الوسط إلى درجة حرارة (٤٥-٥٠ م°) وأفرغ في أطباق بتري معقمة. استُخدم الوسط لاختبار مضخات التدفق (Anbazhagan et al., 2019).

### ٣-٢-٤-١-7: وسط اكار سترات السيمون (Simmons citrate agar)

للكشف عن قدرة البكتيريا لاستخدام السترات كمصدر وحيد للكربون ، حُضِّر وسط اكار سيمون السترات حسب توجيهات الشركة المنتجة بإذابة ٢٤,٢٨ غم من مسحوق الوسط في لتر من الماء المقطر، وعقم بالمؤصدة ، ثم ترك ليبرِّد إلى درجة حرارة ٤٥-٥٠ م° ووزَّع في أنابيب معقمة وترك ليتصلب بصورة مائلة (Nampalliwar et al., 2023).

### ٣-٢-٤-١-8 : وسط حليب الفرز الصلب (Skim milk Agar medium)

استُخدم وسط حليب الفرز بإذابة ٥١,٥ غم من مسحوق الوسط في لتر من الماء المقطر وعقم بالمؤصدة ، وُبُرِّد إلى درجة حرارة ٤٥-٥٠ م° ثم سكب في أطباق معقمة واستخدم هذا الوسط للكشف عن إنتاج إنزيم البروتياز للعزلات البكتيرية قيد الدراسة (Cai et al., 2023).

### ٣-٢-٤-١-٩: وسط اكار ثلاثي السكر والحديد (Triple sugar iron agar)

أُعدَّ الوسط عن طريق إذابة 64.52 غم من مسحوق الوسط في لتر من الماء المقطر وعقم بالمؤصدة، ثم ترك ليصل إلى درجة حرارة ٤٥ - ٥٠ م° ، ثم وزَّع في أنابيب معقمة وترك ليتصلب بصورة مائلة واستخدم هذا الوسط للكشف عن قدرة البكتيريا لتخمير السكريات وإنتاج الغاز (Parija, 2023).

**٣-٢-٤-٢: الأوساط الزرعية التركيبية (Prepared Culture Media)****٣-٢-٤-١: وسط اكار الدم الأساس (Blood agar base)**

جَهِّز هذا الوسط استناداً لتعليمات الشركة المجهزة من خلال إذابة ٤٠ غم من مسحوق الوسط في لتر من الماء المقطر وعقم بالمؤصدة ، بُرِّد إلى درجة حرارة ٤٥-٥٠ م° وأضيف إليه دم الإنسان بنسبة (٣-٥) % ووضع في أطباق معقمة واستخدم كوسط اغنائي في عزل وتشخيص البكتيريا بالإضافة إلى ملاحظة قدرة البكتيريا على تحلل خلايا الدم الحمراء من خلال مناطق تحلل الدم (Mogrovejo et al., 2020).

**٣-٢-٤-٢: وسط مرق نقيع القلب والدماغ (Brain heart infusion broth)**

حسب تعليمات الشركة المجهزة، حُضِّر هذا الوسط بإذابة ٣٧ غم من الوسط في لتر من الماء المقطر وعقم بالمؤصدة ، ثم ترك ليبرِّد إلى درجة حرارة ٤٥-٥٠ م° ، ووزع في أنابيب وتمَّ استخدام هذا الوسط لغرض تنمية وتنشيط البكتيريا فضلاً عن استخدامه لحفظ العزلات البكتيرية وذلك بإضافة ١٥ % من الكليسيروول بعد تعقيمه . (Wang et al., 2024)

**٣-٢-٤-٣: وسط اكار اليوريا (Urea agar)**

استُخدم هذا الوسط للكشف عن قدرة عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* على إنتاج إنزيم اليوريز الذي يحلل اليوريا إلى أمونيا وثنائي أكسيد الكربون ، ووفق تعليمات الشركة المجهزة، حُضِّر بإذابة ٢٤ غم من وسط اكار اليوريا الأساسي في لتر من الماء المقطر وعقم بالمؤصدة ، وبُرِّد إلى درجة حرارة ٤٥-٥٠ م° ثم أضيف ٥٠ مل من محلول اليوريا المحضَّر بإذابة ٤٠ غم من اليوريا في ١٠٠ مل من الماء المقطر وعقم باستخدام مرشحات دقيقة Millipore filters بقطر (٠,٢٢ مايكرو ليتر) وصُب ٥ مل من هذا الوسط في كل انبوبة من الأنابيب الزجاجية المعقمة وتركت للتصلب بصورة مائلة وتعدُّ النتيجة إيجابية عند تحول اللون من الأزرق إلى اللون الوردي (Dagostino and Carradori, 2024).

**٣-٢-٤-٤: وسط الجلاتين (Gelatin media)**

اضيف ٢% من مادة الجيلاتين إلى وسط المرق المغذي (Nutrient broth) وُعْمَ بالمؤصدة وبعد ذلك، صُبَّ في أنابيب اختبار معقمة وحفظت في الثلاجة لحين الاستعمال (Dela Cruz and Torres, 2012).

**٣-٢-٥: الكواشف والمحاليل الكيميائية المستخدمة في تشخيص العزلات قيد الدراسة (The chemical reagents and solutions used in the identification of isolates under study)**

**٣-٢-٥-١: كاشف الاوكسيديز Oxidase reagent**

حُضِر الكاشف أنيًّا وذلك بإذابة ٠,٥ غم من مادة رباعي ميثيل بارافنيلين ثنائي امين ثنائي هيدروكلورايد (Tetra methyl P-phenylene diamine dihydrochloride) في ٥٠ مل من الماء المقطر في قنينة معقمة ومعتمة. استخدم هذا الكاشف للتحري عن قابلية البكتيريا على إنتاج إنزيم الأوكسيديز (Pascual et al., 2014).

**٣-٢-٥-2: كاشف الكاتليز Catalase reagent**

حُضِر هذا الكاشف بخلط ٣ مل من بيروكسيد الهيدروجين ( $H_2O_2$ ) في ١٠٠ مل من الماء المقطر واستخدم للكشف عن قابلية البكتيريا على إنتاج إنزيم الكاتليز (Bolognese et al., 2016).

**٣-٢-٥-3: كاشف فوكس بروسكاور Voges Proskauer reagent**

يتكون هذا الكاشف من محلولين:

❖ محلول هيدروكسيد البوتاسيوم (KOH): حُضِر هذا المحلول بإذابة ٤٠ غم من KOH في ٩٠ مل من الماء المقطر وأكمل الحجم إلى ١٠٠ مل.

❖ محلول الفا نفتول (Alpha-naphthol): حُضِر هذا المحلول بإذابة 5 غم من الفا نفتول (Alpha-naphthol) في ٩٠ مل من الكحول الأثيلي وأكمل الحجم إلى ١٠٠ مل باستخدام الكحول نفسه.

واستخدم هذا الكاشف للكشف عن قابلية العزلات البكتيرية على تخمير سكر الكلوكوز وإنتاج مركب Acetyl methyl carbinol (Chauhan et al., 2020).

**٣-٢-٥-4: كاشف احمر المثيل Methyl Red reagent**

حُضِرَ هذا الكاشف بإذابة ٠,١ غم من صبغة أحمر المثل في ٣٠٠ مل من الكحول الأثيلي (٩٥%) ، ثم استخدم الماء المقطر لإكمال الحجم إلى ٥٠٠ مل، واستخدم هذا الكاشف لتحديد قابلية العزلات البكتيرية على تخمير سكر الكلوكوز (Mcdevitt, 2009).

### ٣-٢-٥: صبغة كرام (Gram Stain)

تمَّ استخدام هذه الصبغة لدراسة الخصائص المظهرية للبكتيريا المعزولة (شكل البكتيريا وحجمها وترتيبها في سلاسل طويلة أو عناقيد غير منتظمة، أو ظهورها بشكل منفرد) ولغرض تفريق البكتيريا إلى بكتيريا سالبة أو موجبة لصبغة كرام (Alturkistani et al., 2016).

### ٣-٢-٥: صبغة البنفسج البلوري (Crystal violet)

حُضِرَت صبغة البنفسج البلوري بتركيزين هما (٠,٥ و ٠,١)%. إذ يتم إذابة (٠,٥ و ٠,١) غم من الصبغة على التوالي في ١٠ مل من الميثانول المطلق، وبعد اكمال الذوبان أكمل الحجم إلى ١٠٠ مل من الماء المقطر، إذ استخدم التركيز ٠,١% للتحري عن انتاج الغشاء الحيوي بطريقة الأنوبية، بينما استخدم التركيز ٠,٥% للتحري عن انتاج الغشاء الحيوي بالطريقة الكمية (Shukla and Rao, 2017).

### ٣-٢-٥: محلول ثابت العكورة القياسي (محلول ماكفرلاند ٠,٥)

يتكون من محولين :

❖ محلول (A) كلوريد الباريوم (١,١٧٥%) : تم إذابة ١,١٧٥ غم من كلوريد الباريوم ( $BaCl_2 \cdot H_2O$ )

في كمية من الماء المقطر وبعدها أكمل الحجم إلى ١٠٠ مل من الماء المقطر.

❖ محلول (B) حامض الكبريتيك (١%) : أضيف ١ مل من حامض الكبريتيك المركز ( $H_2SO_4$ ) إلى ٩٩

مل من الماء المقطر.

مزج ٠,٥ مل من محلول A مع ٩٩,٥ مل من محلول B في أنابيب زجاجية ذات سداد محكم لمنع التبخر

(Naphtali et al., 2020).

### ٣-٢-٦: زرع المسحات (Swab culture)

زرعت المسحات المأخوذة من إفرازات الأذن القيحية للأشخاص المصابين على وسط اكار الدم Blood agar) و اكار الماكونكي (MacConkey agar) ووسط السابرويد دكستروز (Sabouraud dextrose agar) باستخدام طريقة التخطيط، وحُضنت عند درجة حرارة (30-37 م°) لمدة 24-48 ساعة للتحري عن العزلات الميكروبية.

### ٧-٢-٣: تشخيص الاجناس الميكروبية (Genus Identification of Microbial Isolates)

#### 1-7-2-3: تشخيص العزلات الفطرية (Identification of fungal isolates)

شخصت العزلات الفطرية اعتمادًا على الخصائص المظهرية للعزلات من خلال ملاحظة شكل ولون وحجم المستعمرات فيما يخص الخمائر، بالإضافة الى شكل الخيوط الفطرية وتفرعاتها فيما يتعلق بالاعفان ، من ناحية أخرى، تمّ إجراء فحص مجهري لكل عزلة فطرية، وذلك بوضع قطرة من هيدروكسيد البوتاسيوم (20%) في منتصف الشريحة، ونقل جزء صغير من المستعمرة أو الخيوط الفطرية بوساطة عروة الناقل المعقمة ومزجت مع هذه القطرة بعد ذلك تمّ وضع غطاء الشريحة وفحصت الشرائح بالمجهر الضوئي تحت العدسة (40X) (Ponka and Baddar, 2014).

#### 2-7-2-3: تشخيص العزلات البكتيرية (Identification of bacterial isolates)

شخصت العزلات على أساس الصفات الزرعية والمجهرية بالإضافة إلى الفحوصات الكيموحيوية وكما يأتي:

#### 1-2-7-2-3: الصفات الزرعية (Cultural Characteristics)

تمّت دراسة السمات المظهرية للعزلات البكتيرية على الأوساط الزرعية بالاعتماد على الصفات المظهرية التي تشمل شكل ولون المستعمرة، وحجمها وحوافها وقوامها ورائحتها (Jasim, 2020).

#### 2-2-7-2-3: الفحوصات المجهرية (Microscopic Examination)

تمّ إجراء الفحص المجهري للخلايا البكتيرية تحت المجهر عن طريق عمل مسحة ومن ثم تصبيغها بصبغة كرام عن طريق نقل جزء من المستعمرة باستخدام عروة الناقل (Loop) إلى شريحة زجاجية نظيفة، وبعد تثبيتها بالحرارة وتصبيغها، تم فحصها تحت العدسة الزيتية للمجهر الضوئي (100X) لغرض معرفة ترتيب وشكل الخلايا الميكروبية وتفاعلها مع صبغة كرام (Froböse et al., 2020).

**3-2-7-2-3: الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests)****1-3-2-7-2-3: فحص الأوكسيديز (Oxidase test)**

وضعت قطرة من كاشف الأوكسيديز على ورقة ترشيح، ثم نقل جزء من المستعمرة البكتيرية بوساطة عود خشبي معقم إلى ورقة الترشيح. إن تحول لون المستعمرة إلى اللون البنفسجي خلال ثواني يعد دليلاً على إيجابية الاختبار (Shields and Cathcart, 2013).

**2-3-2-7-2-3: اختبار الكاتليز (Catalase test)**

نقل جزء من مستعمرة بكتيرية عمرها (١٨-٢٤) ساعة إلى شريحة زجاجية، أضيف إليها قطرة من كاشف بيروكسيد الهيدروجين بتركيز ٣%. يشير ظهور الفقاعات إلى نتيجة اختبار إيجابية وأن البكتيريا لديها القابلية على إنتاج إنزيم الكاتليز الذي يحلل الكاشف إلى أوكسجين وماء (Reiner, 2010).

**3-3-2-7-2-3: اختبار تحلل الدم (Hemolysis test)**

تمّ الكشف عن قابلية العزلات البكتيرية قيد الدراسة على تحلل خلايا الدم الحمراء من عدمها ، وملاحظة نوع التحلل حول المستعمرات البكتيرية، كاملاً أو جزئياً ، من خلال زراعة هذه العزلات على وسط اكار الدم (Blood agar) بطريقة التخطيط وحُضنت بدرجة حرارة ٣٧ م° ولمدة ٢٤ ساعة (Yeh et al., 2009).

**4-3-2-7-2-3: النمو بدرجتي حرارة ٤ م° و ٤٢ م°**

زرعت العزلات البكتيرية باستخدام طريقة التخطيط (Streaking) على وسط الاكار المغذي (Nutrient agar) وحُضنت عند درجة حرارة ٤٢ م° و ٤ م° لمدة (٢٤-٤٨) ساعة، يعد وجود النمو دليلاً على إيجابية الاختبار (Bisht and Wakeman, 2023; Midhat and Abed, 2023).

**5-3-2-7-2-3: اختبار فوكس بروسكاور (Voges Proskauer test)**

لتح الوسط المحضّر (MR-VP) بالبكتيريا المراد فحصها وحُضن عند درجة حرارة ٣٧ م° ولمدة ٢٤ ساعة، بعدها اضيف ٦ قطرات من محلول كاشف الفا نفثول وقطرتين من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم على التوالي. بعد المزج في أنبوبة الاختبار، يدل ظهور اللون الوردي على نتيجة موجبة (Mcdevitt, 2009).

**6-3-2-7-2-3: اختبار احمر المثيل (Methyl Red test)**



لقح الوسط المُحضّر (MR-VP) بالبكتيريا المراد فحصها وحُضن عند درجة حرارة ٣٧ م° ولمدة ٢٤ ساعة وبعدها تم إضافة ٥ قطرات من كاشف احمر المثل إلى كل أنبوبة. أنّ ظهور اللون الأحمر يدلّ على إيجابية الفحص ممّا يشير إلى قابلية البكتيريا على تخمير سكر الكلوكوز (Mcdevitt, 2009).

### 7-3-2-7-2-3 : اختبار الاندول (Indole test)

حُضّر وسط ماء البيبتون السائل من خلال إذابة ١٥ غم من الوسط في لتر من الماء المقطر وعقم بالمؤصدة بُرد الوسط إلى درجة حرارة (٤٥-٥٠) م°، ثم لُقح بمستعمرات بكتيرية بوساطة عروة الناقل المعقم وحُضن عند درجة حرارة ٣٧ م° لمدة (٢٤ - ٤٨) ساعة، بعدها أُضيفت ٥ قطرات من كاشف كوفاكس على الجدار الداخلي للأنبوبة، أنّ ظهور حلقة حمراء دليل على إيجابية الفحص مما يشير إلى قابلية البكتيريا على تحويل الحامض الاميني التربتوفان (Tryptophan) إلى الأندول نتيجة امتلاكها إنزيم (Chauhan et tryptophanase) (Chauhan et al., 2020).

### 8-3-2-7-2-3: فحص إنتاج انزيم التجلط (Coagulase test)

وُضع ٠,٥ مل من البلازما في أنابيب معقمة، ثم نقلت مستعمرة بكتيرية عمرها (١٨-٢٤) ساعة باستخدام عروة الناقل المعقم إلى الأنابيب التي تحتوي على البلازما، بعد تحريكها جيّدًا حُضنت عند درجة حرارة ٣٧ م° لمدة أربع ساعات، يُعدّ تجلط البلازما دليلًا على إيجابية الاختبار (Timothy et al., 2023).

### 9-3-2-7-2-3: اختبار انزيم اليوريز (Urease test)

لقح وسط اكار اليوريا المائل بالبكتيريا المراد فحص قابليتها على إنتاج انزيم اليوريز (Urease) ، وحُضن عند درجة حرارة ٣٧ م° لمدة (٢٤ - ٤٨) ساعة، أنّ تحول لون الوسط إلى اللون الوردي دليل على الفحص الموجب (Dagostino and Carradori, 2024).

### 10-3-2-7-2-3: اختبار استهلاك السترات (Citrate utilization test)

لقح وسط اكار سترات السيمون المائل بالبكتيريا لتحديد قابليتها على استهلاك السترات كمصدر وحيد للكربون، بعد فترة حضانة لمدة (٢٤-٤٨) ساعة عند درجة حرارة ٣٧ م°، يُعدّ تغيير لون الوسط من الأخضر إلى الأزرق مؤشرًا إيجابيًا للاختبار (Kohlerschmidt et al., 2021).

### 11-3-2-7-2-3: اختبار ثلاثي السكر والحديد (Triple sugar iron test)

لقت أنابيب وسط اكار ثلاثي السكر والحديد المائل بالبكتيريا لتحديد قابليتها على تخمير السكريات وإنتاج الغاز، بعد فترة حضانة (٢٤-٤٨) ساعة عند درجة حرارة ٣٧ م°. يدل ظهور اللون الأصفر في الوسط على تخمير السكريات بينما يشير اللون الأسود في قعر الأنبوبة إلى إنتاج غاز  $H_2S$  وهذه دلالة على النتيجة الموجبة (Parija, 2023).

### 12-3-2-7-2-3: اختبار تسييل الجيلاتين (Gelatin liquefaction test)

لقت المستعمرات البكتيرية في الأنابيب الحاوية على وسط الجلاتين وحُضنت الأنابيب لمدة (٢٤ - ٤٨) ساعة عند درجة حرارة ٣٧ م°، وبعد إنتهاء فترة حُضن الأنابيب وضعت في الثلاجة لمدة ٣٠ دقيقة. تُعدُّ النتيجة إيجابية عند ملاحظة سيولة الجيلاتين (Dela Cruz and Torres, 2012).

### 13-3-2-7-2-3 : اختبار الحركة (Motility Test)

لقت الأنابيب الحاوية على وسط الاكار المغذي بالمزروع البكتيري بطريقة الطعن، وحُضنت عند درجة حرارة ٣٧ م° لمدة ٢٤ ساعة. حُدِّت قدرة البكتيريا على الحركة من خلال وجود ضبابية حول منطقة الطعن (Turnbull and Whitchurch, ٢٠١٤).

### ٨-٢-٣: تشخيص أكثر أنواع البكتيريا شيوعًا باستخدام جهاز الفايترك (Identification of the most common bacterial species using the Vitek 2 compact system)

يحتوي جهاز الفايترك على بطاقات إلكترونية خاصة بأنواع الاحياء المجهرية وحسب الشركة المجهزة يتم العمل بها حيث يعطي الجهاز نتائج دقيقة تصل دقتها إلى ٩٩% في وقت قصير (Moehario et al., 2021).

❖ حُضِر العالق البكتيري المراد تشخيصه بنقل (٢-٣) مستعمرة بكتيرية بعمر ٢٤ ساعة إلى أنبوبة (khan tube) تحتوي على ٣ مل من المحلول الملحي الفسلجي ثم خلطهم معًا باستخدام المازج (Vortex)

- ❖ ضبطت عكورة العالق البكتيري بين ٠,٦٣ - ٠,٥ ماكفرلاند بجهاز Densi-Chek ثم نقلت كمية من هذا المزيج إلى بطاقات Gram Negative identifier (GN-ID) بواسطة ربط البطاقة في الأنبوب الناقل.
- ❖ وضع الحامل في غرفة مفرغة من الهواء (Vacuum chamber) إذ أن عملية تفريغ الهواء تعمل على البكتيريا إلى البطاقة فضلاً عن توزعها في الحفر الموجودة فيها.
- ❖ تم إدخال حامل الكاسيت إلى غرفة محكمة الإغلاق في جهاز الفايترك وحضنه عند درجة حرارة 35 م° لمدة تصل إلى 8 ساعات بعد ذلك، يتم تحدد الكائن المجهرى بدقة.

### ٩-٢-٣: اختبار حساسية الزانفة الزنجارية للمضادات الميكروبية (Antimicrobial Susceptibility Test , AST)

استخدم جهاز الفايترك لتحديد حساسية ومقاومة عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* وفقاً لما ذكر في (Pincus, 2010) باستخدام بطاقة اختبار حساسية المضادات الحيوية الموزعة على ٦٤ حفرة، ولكل مضاد حيوي أكثر من تركيز ويتم تسجيل التركيز المطلوب و النتائج وفقاً لتعليمات شركة BioMerieux .  
طريقة العمل:

١. لفتحت عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* في وسط المرق المغذي (Nutrient broth) وتمَّ حُضنها لمدة ٢٤ ساعة عند درجة حرارة ٣٧ م°.
٢. وضع ٣ مل من المحلول الملحي الفسلجي (Normal saline) في أنبوبة (Khan tube) ، وبعدها أخذت المستعمرات البكتيرية باستخدام عروة الناقل (Loop) ووضعها في الأنبوبة لتحضير عالق بكتيري، ثم تم قياس كثافة العالق باستخدام جهاز Vitek Densichek لتكون بين ٠,٥-٠,٦٣ ماكفرلاند.
٣. أخذ ١٤٥ ميكروليتر من العالق البكتيري وأضيف إلى الأنبوبة الخاصة باختبار الحساسية.
٤. تم إدخال الأشرطة مع الأنابيب إلى الجهاز، وبعدها تمت طباعة نتائج اختبار الحساسية عند ظهور النتيجة.

### ١٠-٢-٣: حفظ العزلات البكتيرية وإدامتها (Preservation and Maintenance of Bacterial Isolates)

١-١٠-٢-٣: الحفظ قصيرة الامد للعزلات (Short term maintenance)

لقت العزلات البكتيرية *P. aeruginosa* على وسط اكار المغذي باستخدام طريقة التخطيط على السطح المائل، بعدها حضنت الأنابيب لمدة ٢٤ ساعة عند درجة حرارة ٣٧ م° وتخزينها عند درجة حرارة ٤ م° وكررت عملية الحفظ شهرياً (Zhgun et al., 2020).

### ٢-١٠-٢-٣: الحفظ طويل الامد للعزلات (Long term maintenance)

استخدم وسط مرق نقيع القلب والدماغ المضاف إليه الكليسرول بنسبة ١٥%، وعقم بالمؤصدة ، بعد ذلك لقت الأنابيب التي تحتوي على ٥ مل من الوسط الزرع البكتيري، وحُضنت الأنابيب لمدة ٢٤ ساعة عند درجة حرارة ٣٧ م° ، وحفظت في المجمدة عند درجة حرارة ٢٠- م° (Shakir and Lafta , 2019).

### ١١-٢-٣: الكشف عن بعض عوامل الضراوة في بكتيريا الزائفة الزنجارية (Detection of some virulence factors in *P. aeruginosa*)

#### ١-١١-٢-٣: التحري عن إنتاج صبغة البايوسيانين (Detection of Pyocyanin Production)

تم الكشف عن قدرة عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* قيد الدراسة على إنتاج صبغة من خلال زراعة هذه العزلات على وسط اكار الدم، وسط الاكار المغذي، وسط المولر هنتون، وسط اكار الماكونكي ووسط اكارالسترمايد بطريقة النشر (Spreading method) ثم حُضنت بدرجة حرارة ٣٧ م° ولمدة ٢٤ ساعة (Al-Shammary, 2015).

#### ٢-١١-٢-٣: التحري عن إنتاج البروتيز (Detection of Protease Production)

اجري هذا الاختبار وفق ما ورد في (Abebe et al., 2014; Chandran et al., 2014) ، إذ حُضِر العالق البكتيري من عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* في وسط المرق المغذي (Nutrient broth) لمدة ١٨ ساعة عند ٣٧ م°، وتم عمل حفر في وسط اكار الحليب باستخدام ثاقب فليبي معقم بقطر ٥ ملم. بعد إزالة أقراص الاكار، تم أخذ ٠,١ مل من العالق البكتيري باستخدام الماصات الدقيقة (Micropipette) ووضعها في الحفرة، بعدها حُضنت الأطباق عند درجة حرارة ٣٧ م° ولمدة (١٨-٢٤) ساعة، تمَّ التحري عن مناطق التحلل حول الحفر عند انتهاء فترة الحُضن كدليل على أنتاج انزيم البروتيز.

#### ٣-١١-٢-٣: الكشف المظهري عن مضخات التدفق (Phenotypic detection of efflux pump)

اجري الكشف عن مضخات التدفق في ٣٠ عزلة تعود لبكتيريا *P. aeruginosa* باستخدام طريقة العجلة- اكار بروميد الاثيديوم (Ethidium Bromide agar-Cartwheel method EtBr-CW) تعتمد

الطريقة على تراكيز مختلفة من صبغة بروميد الاثيديوم كدليل للكشف المظهري (Ugwuanyi *et al.*, 2021). اجري الكشف حسب الخطوات الآتية:

١. لقت عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* في ٥ مل من وسط مرق نقيع القلب والدماغ وحُضنت لمدة ٢٤ ساعة عند ٣٧ م°، ثم تم تخفيفها باستخدام محلول ملحي فسلجي وقورن بمحلول ماكفرلاند القياسي ذو التركيز ٠,٥ %.
٢. حُضرت صبغة بروميد الاثيديوم بتراكيز مختلفة (٠,٥، ١، ١,٥، ٢) مليغرام / لتر عن طريق إضافة (٠,٥، ١، ٢، ٣، ٤) مايكروليتر من الصبغة المذكورة لكل طبق يحتوي على وسط مولر هنتون بعد تعقيمه وتبريده قليلاً.
٣. رج الوسط جيداً وصب في أطباق معقمة وتركت لتتصلب بدرجة حرارة الغرفة ثم قسمت الاطباق بشكل شعاعي.
٤. مررت المسحات القطنية المعقمة على العزلة البكتيرية المخففة، ثم تم الضغط على الجدار الداخلي للطبق للتخلص من العالق البكتيري الزائد وزرعها بشكل شعاعي من مركز الطبق إلى حافته لكل عزلة وتركيز.
٥. حُضنت الأطباق عند درجة حرارة ٣٧ م° لمدة ٢٤ ساعة، تم اختبار العزلات البكتيرية باستخدام مصدر للأشعة فوق البنفسجية لملاحظة شدة التألق.

### ٣-٢-١١-٤: الكشف عن قدرة عزلات بكتيريا الزائفة الزنجارية لتكوين الغشاء الحيوي (Detection of biofilm formation ability in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates)

#### ٣-٢-١١-٤-١: الكشف النوعي عن الأغشية الحيوية (Qualitative detection of Biofilms)

تم التحري عن قدرة عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* على تكوين الأغشية الحيوية بأنبوع طريقة الأنبوب الموصوفة من قبل (Rewatkar, 2013) وفق الخطوات الآتية:

- تنمية العزلات الفتية في ١٠ مل لكل انبوب من وسط Brain heart infusion broth من خلال تلقح الوسط بعروة كاملة من كل عزلة وحُضنت عند درجة حرارة ٣٧ م° لمدة ٢٤ ساعة.
- سكب العالق البكتيري وغسل الأنابيب بالمحلول الملحي الفسلجي وتركت حتى تجف.
- ملئ الأنابيب بصبغة البنفسج البلوري (Crystal violet) ٠,١ % وتركت لمدة ١٠ دقائق وقلبت الأنابيب حتى تجف.

➤ صنفت قدرة عزلات بكتيريا الزائفة الزنجارية (*P. aeruginosa*) على تكوين الأغشية الحيوية من خلال ظهور طبقة بنفسجية على الجدران الداخلية وأسفل الأنبوبة على أنها ملتصقة بقوة، أو متوسطة الالتصاق، أو ملتصقة بشكل ضعيف، أو غير ملتصقة.

### ٢-٣-١١-٤-٢: الكشف الكمي عن الأغشية الحيوية (طريقة صفائح المعايرة الدقيقة Microtiter plates method, MTP)

تمّ الكشف عن قدرة عزلات بكتيريا الزائفة الزنجارية (*P. aeruginosa*) لتكوين الغشاء الحيوي بطريقة صفائح المعايرة الدقيقة (microtiter plates method, MTP) وفقاً لما جاء في (Akinduti et al., 2021)، وحسب الخطوات الآتية:

١. لقتت العزلات الفتية في ٥ مل من وسط مرق نقيع القلب والدماغ ( Brain Heart infusion broth) و حُضنت عند درجة حرارة ٣٧ م° لمدة ٢٤ ساعة.
٢. خففت البكتيريا بنفس الوسط وقورن بمحلول ماکفرلاند القياسي ذو التركيز ٠,٥%، بعدها نقل ٢٠٠ ميكروليتر من العالق البكتيري المخفف إلى كل حفرة في صفيحة المعايرة الدقيقة وبواقع ثلاث مكررات لكل عزلة. تمت إضافة وسط مرق نقيع القلب والدماغ غير المزروع في الحفر واستخدام كسيطرة Control ثم حضنت صفيحة المعايرة الدقيقة عند ٣٧ م° لمدة ٢٤ ساعة بعد إغلاقها بإحكام.
٣. سكب العالق البكتيري الموجود في الحفر وغسلت الحفر ثلاث مرات بالمحلول الفسلجي.
٤. جففت الصفيحة الدقيقة في الفرن عند درجة حرارة ٦٠ م° لمدة ٣٠ دقيقة.
٥. اضيف لكل حفرة ٢٠٠ ميكروليتر من صبغة البنفسج البلوري المحضرة بتركيز ٠,٥% وتركت لمدة ١٥ دقيقة.
٦. سكبت الصبغة وغسلت الحفر ثلاث مرات بالمحلول الفسلجي وجففت.
٧. أضيف لكل حفرة ٢٠٠ ميكروليتر من حامض الخليك الثلجي المحضّر بتركيز ٣٣%.

٨. تم قياس الكثافة الضوئية (Optical Density (OD) عند طول موجي ٦٣٠ نانوميتر باستعمال جهاز الأليزا (ELISA).

حددت كفاءة العزلات البكتيرية على تكوين الغشاء الحيوي من خلال مقارنة القراءات التي تم الحصول عليها وكما يأتي:

✚ تُعدُّ العزلة غير مكونة للغشاء الحيوي إذا كان معدل الكثافة الضوئية لمعامل السيطرة أكبر أو يساوي معدل الكثافة الضوئية للعزلة ( $OD_c \geq OD$ ).

✚ تُعدُّ العزلة ذات تكوين ضعيف للغشاء الحيوي إذا كان معدل الكثافة الضوئية للعزلة البكتيرية أكبر من معدل الكثافة الضوئية للسيطرة أو يساوي أو أصغر من ضعفي الكثافة الضوئية للسيطرة ( $OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$ ).

✚ تُعدُّ العزلة ذات تكوين متوسط للغشاء الحيوي إذا كان معدل الكثافة الضوئية للعزلة البكتيرية أكبر من ضعفين الكثافة الضوئية للسيطرة أو أصغر أو يساوي أربعة أضعاف الكثافة الضوئية للسيطرة ( $2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$ ).

✚ تُعدُّ العزلة ذات تكوين شديد للغشاء الحيوي إذا كان معدل الكثافة الضوئية للعزلة البكتيرية أكثر من أربعة أضعاف معدل الكثافة الضوئية للسيطرة ( $OD > 4 \times OD_c$ ).

### 12-2-3: التوصيف الجزيئي لبكتيريا الزائفة الزنجارية (Molecular characterization of

#### *Pseudomonas aeruginosa*)

### 1-12-2-3: استخلاص الحامض النووي من بكتيريا الزائفة الزنجارية (DNA Extraction from

#### *Pseudomonas aeruginosa*)

تمَّ استخلاص الدنا DNA باستخدام عدة الاستخلاص (Genomic DNA extraction kit) المجهزة من شركة Geneaid تبعاً للطريقة الموصوفة من قبل (Ali and Al-Jaff, 2021) وحسب الخطوات الآتية:

١. نقل ١ مليلتر من العزلات البكتيرية المزروعة على وسط مرق نقيع القلب والدماغ بعمر ٢٤ ساعة إلى أنابيب أبنودورف (١,٥ مل) ورسبت الخلايا البكتيرية في جهاز الطرد المركزي بسرعة ١٤٠٠٠-١٦٠٠٠ (دورة / الدقيقة) ولدقيقة واحدة وسحب العالق باستخدام الماصة وترك الراسب.

٢. أضيف ١٨٠ ميكروليتر من دارىء GT ومزجت المحتويات جيّداً بالمازج (Vortex) لمدة ٥ ثوانٍ.

٣. أضيف ٢٠ ميكروليتر من البروتينيز Proteinase k إلى محتويات الأنبوب، ثم حُضنت الأنابيب عند درجة حرارة ٦٠ م° لمدة ١٠ دقائق، مع تحريك المحتويات كل ٣ دقائق.
٤. أضيف ٢٠٠ ميكروليتر من الدارء GT ومزجت المحتويات جيداً بالمازج لمدة ١٠ ثوانٍ، حُضنت الأنابيب عند درجة حرارة ٧٠ م° لمدة ١٠ دقائق في حمام مائي وتم رج الأنابيب ثلاث مرات خلال فترة الحضانة كل ٣ دقائق حتى يصبح المحلول صافياً.
٥. أضيف ٢٠٠ ميكروليتر من الإيثانول المطلق (Absolute ethanol) ، ثم مزج الخليط بقوة.
٦. تم وضع عمود GD في أنبوب جمع (Collection tube) سعة ٢ مل وتمّ نقل الخليط إليه ، تمّ إجراء الطرد المركزي بسرعة ١٤٠٠٠-١٦٠٠٠ (دورة / الدقيقة) ولدقيقتين، وبعد ذلك تم نقل المحتويات إلى أنبوب تجميع جديد (تم إهمال أنابيب التجميع ونقل المرشحات إلى أنابيب جديدة).
٧. تمت إضافة ٤٠٠ ميكروليتر من دارء WI إلى عمود GD ثم طردت الأنابيب مركزياً بسرعة ١٦٠٠٠ دورة في الدقيقة لمدة ٣٠ ثانية
٨. تم وضع عمود GD في أنابيب جمع جديدة وأضيف إليه ٦٠٠ مايكرو ليتر من دارء الغسيل Wash buffer وطرّدت مركزياً لمدة ٣٠ ثانية وبسرعة ١٦٠٠٠ (دورة / دقيقة).
٩. كرر الطرد المركزي لمدة ثلاث دقائق وبنفس السرعة لتجفيف العمود. نقل العمود المجفف إلى أنبوبة ابندروف نظيفة ١,٥ مل.
١٠. تمّ اضافة ١٠٠ مايكروليتر من دارء الاسترداد Elution buffer المسخن مسبقاً وترك ٥ دقائق للإذابة، وبعدها طردت الأنابيب مركزياً بسرعة ١٦٠٠٠ (دورة/ دقيقة) لمدة ٣٠ ثانية وخزن بعد ذلك نموذج الدنا في درجة حرارة ٢٠- م° لحين الاستخدام.

### ٢-١٢-٢-٣: تحضير مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR Master Mixture)

#### ١-٢-١٢-٢-٣: تحضير محاليل البوادئ (Primers Solutions)

حُضرت محاليل البوادئ المستخدمة في هذه الدراسة والمشار إليها في الجدول (٣-٦) تبعاً لتعليمات الشركة (Macrogen) باستعمال ماء خالي من النيوكلييز للحصول على تركيز ١٠٠ بيكومول / مايكروليتر، إذ تمّ تحضير المحلول بشكل منفصل لكل بادئ بتركيز ١٠ بيكومول/ مايكروليتر وذلك بأخذ ١٠ مايكروليتر من محلول كل بادئ خزين Stock وأضيف له ٩٠ مايكروليتر من ماء خالي من النيوكلييز ومزج باستخدام المازج (Vortex) ، وحفظت المحاليل عند درجة حرارة ٢٠ - م° مع مزج المحلول البادئ بعد الاستخراج من الثلجة وعند الاستخدام.



### 2-2-12-2-3 : مزيج Master Mix

استخدم مزيج Master Mix المجهز من قبل شركة (Bioneer) الكورية والمبينة مكوناته في الجدول 3-8

الجدول 3-8 : مكونات مزيج Master Mix المستخدم في تفاعل البلمرة المتسلسل

| المكونات            | التركيز  |
|---------------------|----------|
| Taq DNA Polymerase  | 2.5 U/ml |
| PCR Reaction Buffer | 1X       |
| dNTPs               | 2.5 Mm   |
| Gel loading buffer  | 1 X      |

### 3-2-12-2-3 : تحضير منتج تفاعل البلمرة المتسلسل ( PCR Product )

أضيفت جميع المكونات اللازمة لإجراء تفاعل البلمرة المتسلسل في الانابيب الموجودة في العدة ( PCR tubes ) وكما موضحة في الجدول 3-9.

الجدول 3-9 : المكونات اللازمة لإجراء تفاعل البلمرة المتسلسل

| ت  | المكونات            | الحجم بالميكروليتر |
|----|---------------------|--------------------|
| ١. | DNA Sample          | 3                  |
| ٢. | Primer Forward      | 2                  |
| ٣. | Primer Reversed     | 2                  |
| ٤. | Nuclease free Water | 8                  |
| ٥. | Master Mix          | 10                 |
|    | Total volume        | 25                 |

### 4-2-12-2-3 : إجراء تفاعل البلمرة المتسلسل ( PCR Assay )

لإجراء تفاعل البلمرة المتسلسل تغلق الانابيب وتمزج المكونات بجهاز المازج (Vortex) لمدة ١٠ ثواني وتدخل إلى جهاز PCR Thermocycler، وخطوات التفاعل الخاصة لكل بادئ موضحة في الجدول 3-10.

الجدول 3-10: خطوات برمجة جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل الخاصة بالبيودئ المستخدمة في الدراسة

| عدد الدورات | الوقت    | درجة الحرارة °م | الخطوة                                      |
|-------------|----------|-----------------|---|
| دورة واحدة  | ٣ دقيقة  | ٩٥              | مرحلة المسخ الاولي Initial DNA Denaturation |
|             | ٣٠ ثانية | ٩٤              | مسخ الدنا DNA Denaturation                  |
| ٣٣ دورة     | ٣٣ ثانية | 62              | <i>rRNA 16S</i>                             |
|             |          | 62              | <i>ndvB</i>                                 |
|             |          | 62              | <i>tssCI</i>                                |
|             |          | ٥٢              | <i>PslA</i>                                 |
|             |          | 56              | <i>PslD</i>                                 |
|             |          | 56              | <i>mexB</i>                                 |
| دورة واحدة  | ٥٥ ثانية | ٧٢              | الاستطالة Extension                         |
|             | ٥ دقيقة  | ٧٢              | مرحلة الاستطالة النهائية Final Extension    |

3-12-2-3: الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز (Agarose gel electrophoresis)

1-3-12-2-3: صبغة بروميد الاثيديوم (Ethidium Bromide stain)

استخدمت هذه صبغة بالهيئة المجهزة بها من شركة Bio BASIC INC.

2-3-12-2-3: تحضير دارئ (Tris-Borate-EDTA, TBE buffer)

تمّ تحضيره بإضافة 1٠0 مل من المحلول الخزين 10 X TBE إلى 9٠0 مل من الماء المقطر المعقم وذلك للحصول على تركيز 1x من الدارئ، وحفظ في قنينة زجاجية معقمة بدرجة حرارة ٢ م ° لحين الاستعمال.

3-3-12-2-3: تحضير هلام الاكاروز Prepare agarose gel

حُضّر هلام الاكاروز بتركيز ١,٥ % بإذابة ٠,٧٥ غم من الاكاروز في ٥٠ مليلتر من محلول TBE buffer بتركيز 1x ، إذ سخن الاكاروز إلى درجة الغليان و بُرِّد ه إلى درجة حرارة (٤٥-٥٠) م ° ، وبعدها أضيفت إليه ٣ مايكرو ليتر من صبغة بروميد الاثيديوم ومزج مع هلام الاكاروز جيداً ، ثم صب في قالب الترحيل (Tray) بشكل هادئ ومستمر بعدما تم تثبيت المشط (Comb) لتكوين الحفر (Wells) المعدة لتحميل العينات وترك المزيج ليتصلب بدرجة حرارة الغرفة ثم رفع المشط بهدوء ونقل مع القالب إلى حوض الترحيل لإجراء عملية الترحيل الكهربائي (Green and Sambrook, 2019).

**3-2-12-4: الكشف عن نواتج التضاعف (Detection of Amplification Products)**

تمّ الكشف عن نواتج التضاعف بترحيل العينات على هلام الأكاروز المحضّر بتركيز ١,٥% ، إذ تم تحميل ٣ مايكرو ليتر من العينات فضلاً عن تحميل ٣ مايكرو ليتر من الدليل الحجمي (DNA Ladder) ، ومن ثم تمّ ترحيل النواتج والدليل الحجمي كهربائياً بفرق جهد ٥٠ فولت لمدة ساعة واحدة، وفُحص الهلام عبر تعريضه لمصدر للأشعة فوق البنفسجية وقدرت الأحجام الجزيئية للقطع المتضاعفة من خلال مقارنتها مع مواقع الحزم للدليل الحجمي.

**3-2-13: النمذجة الجزيئية لانزيم الأدينيلات كائيز (Molecular modeling of adenylate kinase)**

لنمذجة التركيب ثلاثي الأبعاد لانزيم Adk في العزلة القياسية لبكتيريا *P.aeruginosa* ATCC3686 (PAO1)، استخدم تسلسل الأحماض الأمينية الخاصة بالانزيم الموجودة في قواعد البيانات الوراثية للجينات والجينوم (KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) ، تمّ تقديم تسلسل هذه الأحماض الأمينية الى برنامج Swiss model لتنبؤ بتركيب الانزيم المذكور من خلال عمليتي النمذجة والتحليل (<https://swissmodel.expasy.org/>) ، تستخدم هذه المجموعة المتاحة على الويب طرق الكشف عن التماثل لبناء نماذج بروتينية ثلاثية الأبعاد. قام Swiss model بنمذجة Adk باستخدام ٢٢٠ ثمالة حامض أميني من الانزيم المماثل لبكتيريا *Burkholderia pseudomallei* (BpAdk) كقالب، شُخص التركيب ثلاثي الأبعاد للانزيم الأخير عملياً بوساطة تقنية حيود الأشعة السينية (X-ray diffraction) ، الانزيم موثق في قاعدة بيانات البروتين (Protein Data Bank) و برمز (Buchko et al., 2010) 3GMT، تمّ تحليل وثيقة نموذج تركيب انزيم BpAdk المحصل عليه من البرنامج المذكور اعلاه باستخدام Molprobity version 4.4.

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

**Results & Discussion**

## ٤- النتائج والمناقشة

## ٤-١ : نسبة العزل الميكروبي (Microbial isolation rate)

جمعت 110 مسحة من المرضى الذين يعانون من إصابات الأذن المختلفة والمشخصين سريريًا في العيادة الاستشارية للأنف والأذن والحنجرة في مدينة الإمام الحسين الطبية، بالإضافة إلى العيادات الخارجية في مناطق مختلفة من محافظة كربلاء المقدسة. بعد زراعة العينات، كشفت النتائج أن 97 (88.18%) عزلة أظهرت نموًا ميكروبيًا، من بين هذه العزلات، كانت 92 (94.85%) عزلة مفردة بينما كانت 5 (5.15%) عزلات مختلطة في حين لم يظهر أي نمو في 13 (11.82%) عينة.

وجاءت نسبة العزل المرتفعة مقارنة لدراسة محلية أجريت في محافظة النجف إذ بلغت نسبة العزلات التي أظهرت نموًا (88.46%) وعدم وجود نمو في (11.54%) (Mansor et al., 2023)، توافقت نتائج الدراسة الحالية مع دراسة شملت 100 عينة، أعطت 72 عزلة نموًا بكتيريًا بينما المتبقي لم يلاحظ أي نمو فيها (Kumar and Singh, 2019). وقد يعزى ارتفاع الإصابة الميكروبية للإذن إلى الاستخدام المتكرر لسماعات الإذن وتلوث مياه الاستحمام فضلًا عن انتقال الميكروبات من الجهاز التنفسي العلوي إلى الأذن من خلال أنبوب استاكبوس.

## ٤-2: تشخيص العزلات الميكروبية (Identification of Microbial Isolates)

أسفرت نتائج الزرع على وسط اكار الدم ووسط اكار الماكونكي ووسط اكار السابرويد دكستروز، بعد فترة حضانة 24 ساعة للعزلات البكتيرية و (3-5) أيام للعزلات الفطرية عند درجة حرارة 30-37 م° عن الحصول على 97 عزلة، تم تحديد هذه العزلات الميكروبية على أنها تسبب إصابات الأذن بعد تشخيص أولي يعتمد على خصائص المستعمرات، مثل شكل المستعمرة، لونها وقوامها.

## ٤-٢-١: تشخيص الأجناس الفطرية (Identification of fungal genera)

لوحظت خميرة الكانديدا *Candida spp.* على وسط السابرويد دكستروز ووسط اكار الدم بشكل مستعمرات دائرية بيضاء إلى كريمية اللون، أما في الفحص المجهرى وكانت الخلايا بيضاوية إلى أسطوانية الشكل (Singh et al., 2013)، بالإضافة إلى المستعمرات الزغبية والقطنية من عفن الاسبرجلس *Aspergillus spp.* التي كانت ذات حواف غير منتظمة مع ألوان مختلفة منها الأبيض، البني، الأخضر

والأسمر المائل إلى الصفرة ، أما السمات المجهرية تشير إلى وجود غزل فطري (Mycelium) غزير النمو، متفرع (Heroine et al., 2020).

#### 2-2-4: تشخيص العزلات البكتيرية (Identification of bacterial isolate)

##### 1-2-2-4: الصفات الزرعية والمجهرية (Cultural and microscopic characteristics)

تباينت مستعمرات أجناس بكتيريا *Pseudomonas spp.* من حيث الشكل فمنها ناعمة دائرية صفراء شاحبة على وسط اكار الماكونكي لعدم قدرتها على تخمير سكر اللاكتوز إلى مستعمرات خضراء ذات رائحة تشبه رائحة العنب، بينما ظهرت المستعمرات الأخرى بقوام مخاطي منتشرة على الوسط الاغنائي (وسط اكار الدم)، إذ أظهرت معظم العزلات تحلاً كاملاً للدم، مما أدى إلى ظهور هالة شفافة حول المستعمرة (Qing et al., 2018).

عند إجراء الفحص المجهرى لهذه العزلات المصبوغة بصبغة كرام أظهرت نتيجة سالبة لهذه الصبغة وبشكل عصيات مفردة أو على شكل سلاسل قصيرة (Gompper and Schick, 2007). تم اختيار مستعمرة واحدة من كل عزلة ونقلها إلى وسط السترامايد، وتميزت مستعمرات بكتيريا الزائفة التي نمت على هذا الوسط بشكلها الدائري المنتظم حيث أنه وسط انتقائي لاحتوائه على مادة السترامايد التي تسمح بنمو أنواع بكتيريا الزائفة *Pseudomonas spp.* وتمنع نمو كافة أنواع البكتيريا الأخرى (Wickramasinghe et al., 2019).

نمت بكتيريا المكورات العنقودية *Staphylococcus spp.* على وسط اكار الدم بشكل مستعمرات دائرية محدبة ذات لون أبيض رمادي مع انخفاضات منتظمة ناعمة وتحلل واضح لكريات الدم الحمراء بسبب قدرتها على إنتاج الهيمولايسن ، ومجهرياً ظهرت موجبة لصبغة كرام وبشكل عناقيد غير منتظمة الترتيب (AI-Khafaji et al., 2013).

ظهرت بكتيريا *Escherichia spp.* على هيئة مستعمرات صغيرة ناعمة دائرية ذات حافة وردية اللون على وسط الماكونكي بسبب قدرتها على تخمير سكر اللاكتوز وعندما تم تصبيغها بصبغة كرام ظهرت على شكل عصيات قصيرة سالبة لصبغة كرام ( Najm et al., 2023) .

تلونت مستعمرات بكتيريا الكلبسيلا *Klebsiella spp.* بلون وردي فاتح على وسط الماكونكي وكانت ذات قوام مخاطي الذي يعزى إلى وجود المحفظة (الكبسولة) ، بينما مجهرياً كانت من العصيات السالبة لصبغة

كرام (Feigin et al., 2009). بالنسبة لمستعمرات بكتيريا *Proteus spp.* تتميز نموها بالتموج، وتحول وسط اكار الدم إلى اللون البني وذات رائحة كريهة ، وعلى وسط الماكونكي كانت المستعمرات شاحبة ذات حواف غير منتظمة، وأثناء الفحص المجهرى كانت الخلايا على شكل عصيات سالبة لصبغة كرام (Forbes et al., 2013).

كانت مستعمرات بكتيريا *Bordetella spp.* النامية على وسط اكار الماكونكي بهيئة مستعمرات ناعمة، محدبة، لامعة، شفافة تقريباً، ومحاطة بمنطقة انحلال الدم على وسط اكار الدم، وتحت المجهر ظهرت بشكل عصيات منفردة سالبة لصبغة كرام (Forbes et al., 2013).

أما بكتيريا *Stenotrophomonas spp.* كانت مستعمراتها صغيرة دائرية مرتفعة عديمة اللون على اكار الماكونكي غير مخمرة لسكر اللاكتوز، وذات لون برتقالي مصفر غير انحلاية على اكار الدم ، أما مجهرياً تظهر بشكل عصيات مستقيمة أو منحنية قليلاً وتوجد إما منفردة أو في أزواج (Ghosh et al., 2020).

لوحظت بكتيريا *Burkholderia spp.* على هيئة مستعمرات ناعمة ومرتفعة قليلاً على وسط اكار الدم وذات لون أحمر على اكار الماكونكي بسبب تخمير سكر اللاكتوز، وعلى شكل عصيات سالبة لصبغة كرام في الفحص المجهرى (Al-Nasrawy et al., 2022).

#### ٤-٢-٢: الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests)

لغرض التشخيص المبدئي تم إجراء العديد من الفحوصات الكيموحيوية والتي وصفت من قبل (Sastry, 2018).

أعطت جميع العزلات بنتيجة إيجابية لاختبار الكاتليز Catalase الذي أوضح قابلية البكتيريا على تحلل بيروكسيد الهيدروجين إلى ماء وأوكسجين، في حين اتسمت جميع العزلات بنتيجة سالبة لاختبار الاوكسيدز باستثناء *Pseudomonas spp.* ، *Bordetella spp.* و *Burkholderia spp.* أعطت نتيجة إيجابية إذ تنتج هذه البكتيريا أنزيم الاوكسيدز لأنها تحتوي على سايتوكروم نوع C (Cytochrome C) كجزء من سلسلتها التنفسية (Shields and Cathcart, 2013).

كشفت نتائج اختبار تحلل اليوريا أن الأجناس البكتيرية *Proteus spp.* ، *Klebsiella spp.* ، *Bordetella spp.* و *Burkholderia spp.* تميزت بنتيجة إيجابية، بينما أظهرت العزلات *Escherichia spp.* ، *Stenotrophomonas spp.* و *Pseudomonas spp.* نتيجة سلبية، في حين

كانت *Staphylococcus spp.* متغايرة للاختبار ذاته، يحدد اختبار اليوريا قدرة الأجناس البكتيرية على تحلل اليوريا لإنتاج الأمونيا وثاني أكسيد الكربون ولهذا تؤدي زيادة الرقم الهيدروجيني إلى تغيير اللون من الأصفر الى اللون الوردي (Brink, 2016). بينت نتائج استخدام السترات كمصدر للكربون تفاعلاً إيجابياً من قبل *Klebsiella* و *Pseudomonas spp.*، *Burkholderia spp.*، *Staphylococcus spp.*، بينما كانت نتيجة الفحص متغايرة من قبل *Proteus spp.*، في حين كانت النتيجة سالبة للأجناس المتبقية وكما موضح في الجدول ٤-١.

الجدول ٤-١: - الفحوصات الكيموحيوية لتشخيص العزلات البكتيرية

| ت  | العزلات البكتيرية            | Gram stain | Oxidase | Catalase | Citrate | Urease |
|----|------------------------------|------------|---------|----------|---------|--------|
| ١. | <i>Staphylococcus spp.</i>   | +          | -       | +        | +       | V      |
| ٢. | <i>Escherichia spp.</i>      | -          | -       | +        | -       | -      |
| ٣. | <i>Klebsiella spp.</i>       | -          | -       | +        | +       | +      |
| ٤. | <i>Proteus spp.</i>          | -          | -       | +        | V       | +      |
| ٥. | <i>Bordetella spp.</i>       | -          | +       | +        | -       | +      |
| ٦. | <i>Stenotrophomonas spp.</i> | -          | -       | +        | -       | -      |
| ٧. | <i>Burkholderia spp.</i>     | -          | +       | +        | +       | +      |

الرمز (+): اختبار موجب الرمز (-): اختبار سالب الرمز V (Variable): متغير

لتفريق أنواع البكتيريا الأكثر شيوعاً (*Pseudomonas spp.*)، زرعت البكتيريا على وسط الاكار المغذي وبواقع مكررين لكل عزلة، وحضنت الأولى عند ٤ م° والأخرى عند ٤٢ م°، وأبرزت النتائج قدرة ٣٠ عزلة على النمو عند درجة حرارة ٤٢ م°، ولم تتمكن من النمو عند درجة حرارة ٤ م° وهي خاصية تشخيصية مهمة لنوع بكتيريا *P.aeruginosa* عن بقية الأنواع من جنس *Pseudomonas spp.* التي نمت فقط عند درجة حرارة ٤ م° (Reichler et al., 2018)، بالإضافة إلى هذه الاختبارات اجريت مجموعة من الاختبارات الكيموحيوية ومنها اختبار الأندول (Indole)، المثيل الأحمر (Methyl red)، فوكس بروسكاور



(Voges proskauer)، إنتاج غاز كبريتيد الهيدروجين (H<sub>2</sub>S) وفحص تجلط الدم (Coagulase). أعطت الاختبارات نتيجة سالبة لجميع عزلات *Pseudomonas spp.* قيد الدراسة، بالإضافة إلى إظهار هذه العزلات عدم القابلية على تخمير السكريات الثلاثة (اللاكتوز، السكروز والكلوكوز) عن طريق اختبار ثلاثي السكريات والحديد (Triple Sugar Iron Agar Test) كما استخدم اختبار أنزيم الجيلاتينيز للتفريق بين نوعي *pseudomonas putida* و *fluorescens Pseudomonas* من خلال قدرة الأخيرة على تسييل الجيلاتين الجدول ٤-٢.

الجدول ٤-٢: الفحوصات الكيميوحيوية لأنواع *Pseudomonas spp.*

| ت   | نوع الاختبار        | <i>P. aeruginosa</i> | <i>P. fluorescens</i> | <i>P. putida</i> |
|-----|---------------------|----------------------|-----------------------|------------------|
| ١.  | Gram stain          | -                    | -                     | -                |
| ٢.  | Oxidase             | +                    | +                     | +                |
| ٣.  | Catalase            | +                    | +                     | +                |
| ٤.  | Indole              | -                    | -                     | -                |
| ٥.  | methyl red          | -                    | -                     | -                |
| ٦.  | Voges Proskauer     | -                    | -                     | -                |
| ٧.  | Citrate utilization | +                    | +                     | +                |
| ٨.  | Gelatinase          | V                    | +                     | -                |
| ٩.  | Motility            | +                    | +                     | +                |
| ١٠. | Coagulase           | -                    | -                     | -                |
| ١١. | Urease              | -                    | -                     | -                |
| ١٢. | Triple sugar iron   | K/K                  | K/K                   | K/K              |
| ١٣. | H <sub>2</sub> S    | -                    | -                     | -                |
| ١٤. | Growth test at 42°C | +                    | -                     | -                |
| ١٥. | Growth test at 4°C  | -                    | +                     | +                |

نتيجة موجبة (+) نتيجة سالبة (-) متغاير (V (Variable) قاعدي (K/K (Alkaline/Alkaline

#### 3-4: تشخيص البكتيريا باستخدام جهاز الفايترك (Bacterial identification through the Vitek 2 compact system)

في هذه الدراسة، تمَّ تحديد النوع البكتيري الأكثر شيوعًا على أنها بكتيريا *P.aeruginosa* باستخدام Vitek 2 compact system هذا النظام يعتمد على بطاقات منها Gram-Negative identification card (GN) التي تحتوي على ٤٧ اختبارًا لتحديد البكتيريا السالبة لصبغة كرام بطريقة أسهل وأكثر دقة. بحسب ما هو موضح في الملحق (١) و(٢)، كانت نسبة احتمالية التشخيص مرتفعة تراوحت بين (٩١-٩٩) % لبكتيريا *P. aeruginosa* وجاءت نتائج الاختبارات المستخدمة في هذا النظام أكدت النتائج التي الحصول عليها من الاختبارات المظهرية والمجهريّة والكيموحيوية (الفحوصات التقليدية).

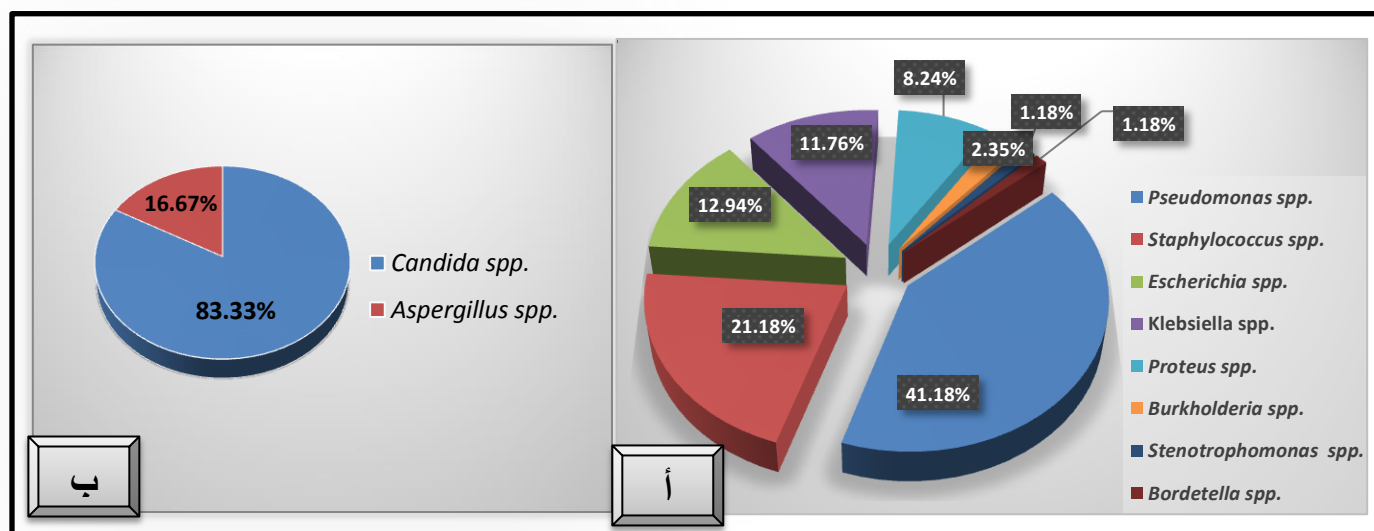
#### 4-4: العزلات الميكروبية المشخصة في هذه الدراسة Identified microbial isolates in this (study)

أسفرت نتائج العزل والتشخيص سابقة الذكر عن سيادة العزلات البكتيرية المرتبطة بإصابات الأذن على العزلات الفطرية ، وكما هو مبين في الشكل 4-1. اشتملت العزلات البكتيرية 85 (٨٧,٦٣%) عزلة في حين شكلت العزلات الفطرية 12 (12.37%) عزلة، اقتصرت العزلات الفطرية على خميرة. *Candida spp* و عفن *Aspergillus spp*. بواقع ١٠ (٨٣,٣٣%) و ٢ (١٦,٦٧%) عزلة على التوالي، وهو ما يتفق مع دراسة سابقة أجريت في أثيوبيا أكدت ان البكتيريا هي السبب الأكثر شيوعًا في إصابات الأذن ، كانت فيها نسبة النمو البكتيري (٩٧,٦%) مقابل (٢,٤%) نموًا فطريًا (Hailu et al., 2016).

من اجمالي العزلات البكتيرية، بلغت العزلات السالبة لصبغة كرام ٦٧ (٧٨,٨٢%) عزلة تضمنت ٣٥ (٤١,١٨%) عزلة تعود لجنس *Pseudomonas spp* وشملت بكتيريا *P.aeruginosa* ، *P.putida* و *P.fluorescens* وبواقع ٣٠ (٣٥,٢٩%) ، ٣ (٣,٥٣%) و ٢ (٢,٣٥%) عزلة على التوالي ، في حين شملت الاجناس الأخرى والتابعة الى العزلات السالبة لصبغة كرام بكتيريا *Escherichia spp* ، *Klebsiella spp* ، *Proteus spp* و *Burkholderia spp* وبواقع ١١ (12.94%) ، ١٠ (١١,٧٦%) ، 7 (8.24%) و ٢ (٢,٣٥%) عزلة على التوالي، وكانت اقل نسبة عائدة لبكتيريا

*Bordetella spp.* و *Stenotrophomonas spp.* بواقع عزلة واحدة (1.18%) لكل جنس بكتيري ، فضلاً عن العزلات البكتيرية الموجبة لصبغة كرام الذي تضمنت ١٨ ( ٢١,١٨ % ) عزلة لبكتيريا *Staphylococcus spp.* ، تتفق نتائج الدراسة الحالية مع دراسة في مصر كانت البكتيريا السالبة لصبغة كرام هي العزلات السائدة (٧٤,٢%) في إصابات الأذن مقارنة بالبكتيريا الموجبة لصبغة كرام (Elmanama *et al.*, 2014).

ب



الشكل ٤-١: توزيع الاحياء المجهرية في إصابات الأذن أ-العزلات البكتيرية ب-العزلات الفطرية

الزنجارية

٤-٥: اختبار حساسية بكتيريا الزانفة

#### Antimicrobial susceptibility test of *P.aeruginosa*

للمضادات الميكروبية

استخدم Vitek 2 compact system لتحديد حساسية عزلات بكتيريا *P.aeruginosa* تجاه ١٢ مضاد حيوي، ومن الجدول 3-4 نلاحظ نمط حساسية مختلف لـ ٣٠ عزلة ، كانت ٦ (٢٠%) عزلات مقاومة لجميع فئات المضادات الحيوية (PDR) التي تم اختبارها و ١٩ (63.٣3%) عزلة مقاومة لجميع المضادات باستثناء فئة أو فئتين (XDR) و ٥ (16.67%) عزلة مقاومة للأدوية المتعددة (MDR)، لكونها مقاومة لفئة واحدة أو أكثر من فئات المضادات الحيوية التي تم اختبارها.

ومن الجدول ذاته نلاحظ المقاومة العالية لمجموعة مضادات البيتا لاكتام  $\beta$ -lactam المستخدمة في هذه الدراسة وتشتمل بشكل رئيسي على البنسلينات (Penicillins)، الكاربابينيمات (Carbapenems)

والسيفالوسبورينات (Cephaloporins). بلغت مقاومة بكتيريا *P. aeruginosa* نسبة 96.67% لكل من مضاد التيكارسيلين (Ticarcillin) والتيكارسيلين/حامض الكلافولانيك (Ticarcillin /Clavulanic acid) العائدة لعائلة البنسلينات بالإضافة إلى مضاد البييراسيلين (Piperacillin) الذي بلغت عنده مقاومة البكتيريا 93.33%. تتقارب هذه النتائج مع دراسة مقاومة بكتيريا *P. aeruginosa* المعزولة من مصادر سريرية حيث بلغت نسبة المقاومة 91.7% لمضاد Ticarcillin ، أشار الباحثان أن هذا النمط من المقاومة يرجع إلى احتمالية الإفراط في استخدام المضادات الحيوية (Khan and Faiz, 2016) . تتقارب أيضاً النسبة العالية للمقاومة مع دراسة في روسيا أجراها مجموعة من الباحثين حيث وجدوا ان 97.6% من العزلات مقاومة لمضاد Ticarcillin/Clavulanic acid (Sukhorukova et al., 2019). اتفقت نتائج مقاومة العزلات في هذه الدراسة تجاه كل من مضادي Ticarcillin و Piperacillin مع دراسة محلية أكد الباحث فيها أن مضاد Ticarcillin أقل نشاطاً من مضاد Piperacillin (Alkaabi, 2013).

هناك أربع آليات أساسية يمكن من خلالها أن تحدث المقاومة البكتيرية لهذه المضادات، أولها يتمثل بإفراز أنزيمات  $\beta$ -lactamases التي تعمل على تفكيك حلقة مضادات البيتا لاكتام  $\beta$ -lactam وبالتالي تدمير الجزيئات المضادة للميكروبات كلياً أو جزئياً، ثانياً تغيير هدف المضاد من قبل البكتيريا الذي يمكن أن يكون بسبب فقدان الكامل للألفة مما يلغي الارتباط بالهدف، ثالثاً التقليل في كمية المضادات البكتيرية التي تصل إلى الهدف عن طريق انخفاض النفاذية ، رابعاً تعمل مضخات التدفق النشطة كآلية أخرى للمقاومة، حيث تقوم بإزالة المضاد الحيوي من موقع عمله قبل أن يتمكن من العمل وهذه آلية مهمة لمقاومة مضادات البيتا لاكتام  $\beta$ -lactam في بكتيريا *P. aeruginosa* (Hasan and Al-Harmoosh, 2020) .

تشير النتائج أيضاً إلى أن عزلات بكتيريا *P.aeruginosa* كانت مقاومة بنسبة 93.33% للسيفالوسبورينات (Cephalosporins) والتي تضمنت في هذه الدراسة مضاد سيفتازيديم (Ceftazidime) من الجيل الثالث ومضاد السيفيبيم (Cefepime) من الجيل الرابع ، تتطابق هذه النتائج مع دراسة محلية في البصرة إذ بلغت نسبة مقاومة البكتيريا لمضاد Cefepime 93.33% (Mahdi Alhamdani and Al- % 93.33 Cefepime) (Mahdi Alhamdani and Al- % 93.33 Cefepime) في حين تقاربت النتائج مع دراسة في الهند بلغت المقاومة تجاه مضاد Ceftazidime (Luaibi, 2020) بنسبة 89.7% (Zatakiya et al., 2022).

تحتوي السيفالوسبورينات على حلقة  $\beta$ -lactam ويمكن أن تعزى مقاومة تلك البكتيريا لهذه المضادات من خلال إمكانية تحلل هذه المضادات بفعل أنزيمات  $\beta$ -lactamases أو تحوير البروتينات المرتبطة

بالبنسلين (PBP)، أو عن طريق تقليل نفاذية المضاد إلى داخل الخلية البكتيريا (Fisher et al., 2023; Araten et al., 2024).

من خلال ملاحظة الجدول 4-3 يتضح ان عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* مقاومة لمضاد الاميبينيم (Imipenem) والميروبيينيم (Meropenem) بنسبة (٩٠ و 86.67) % على التوالي والعائدان لمجموعة مضادات الكاربابينييمات (Carbapenems). تعدّ مقاومة الكاربابينييمات متأصلة في بكتيريا *P. aeruginosa* وتتكون من القابلية على مقاومة عمل المضادات الحيوية بعدة آليات منها عدم وجود هدف محدد، أو اختلاف جوهري في تكوين الغشاء الساييتوبلازمي ، أو عدم القدرة على عبور الغشاء الخارجي ، بالإضافة إلى المقاومة المتأصلة، يمكن للبكتيريا تطوير المقاومة للمضادات الحيوية من خلال إنتاج انزيمات Carbapenemases إذ تقلل هذه الإنزيمات من حساسية البكتيريا للإميبينيم وتسمح بالتحلل المائي لمجموعة واسعة من مضادات البيتا لاكتام  $\beta$ -lactam ، بما في ذلك الكاربابينييمات (Aurilio et al., 2022) . تطابقت نتائج دراستنا مع دراسة أجريت في إيران حيث كانت ٩٠% من العزلات مقاومة لمضاد Imipenem ، اكد الباحثون فيها ان السلالات المخاطية تنتج مستويات واسعة من عديد السكريد الخارجي (exopolysaccharide)، والذي يعمل كحاجز امام انتشار المضادات الحيوية (Nasirmoghadas et al., 2018) .

بلغت مقاومة العزلات البكتيرية لمضادات الأميكاسين (Amikacin)، الجنتاميسين (Gentamicin) والتوبراميسين (Tobramycin) (٨٠، ٩٠ و 86.67) % على التوالي، وتنتمي هذه المضادات إلى مجموعة مضادات الامينوكلايكوسيدات (Aminoglycosides) التي تقتل البكتيريا عن طريق الارتباط بالوحدة الفرعية الريبوسومية 30S (Dagur et al., 2023). تحدث مقاومة الأمينوكلايكوسيدات من قبل البكتيريا من خلال آليات مختلفة تتمثل بتحويل هدف المضاد الحيوي من خلال عملية المثيلة على الحامض النووي 16S rRNA، بالإضافة إلى تغيير نفاذية الجدار البكتيري للمضادات الحيوية وبالتالي تمنع المضادات الحيوية من الدخول إلى الخلية البكتيرية (Yang and Hu, 2022).

تقاربت نتائج الدراسة الحالية مع نتائج الدراسات السابقة حيث بلغت المقاومة لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* بين مرضى التهاب الأذن الخارجية لمضاد Gentamicin بنسبة (٨٨،٥%)، و للمضادين Tobramycin و Amikacin بنسبة ٨٢% و ٧٣% على التوالي (Nikokar et al., 2013; Ibrahim, 2022).

بلغت مقاومة العزلات البكتيرية لمضاد السيبروفلوكساسين Ciprofloxacin نسبة ٨٦,٦٧ % . ينتمي هذا المضاد الحيوي إلى مجموعة المضادات الحيوية الفلوروكينولونات (Fluoroquinolones). أدى الاستخدام المكثف لهذا المضاد الحيوي إلى زيادة مقاومة بكتيريا *P.aeruginosa* من خلال آليتين احدهما تعديل الموقع المستهدف والإفراط في التعبير الجيني المسؤول عن تنظيم مضخات التدفق، والذي يحدث من خلال طفرات في الجينات التي تنظم مضخات التدفق (Rehman et al., 2019).

انخفضت مقاومة العزلات البكتيرية لمضاد الكولستين (Colistin) أو ما يعرف بمضاد البوليمكسين E (Polymixin E) لنسبة ٢٠% . يعمل المضاد على تعطيل بنية الدهون الفوسفاتية في غشاء الخلية، وزيادة نفاذية الخلية البكتيرية، تُعدّ البكتيريا السالبة لصبغة كرام أكثر حساسية بكثير من البكتيريا الموجبة لصبغة كرام لأنها تحتوي على كمية أكبر من الدهون الفوسفاتية في السايئوبلازم والأغشية الخارجية، المقاومة المكتسبة نادرة ولكنها يمكن أن تحدث في بكتيريا *P. aeruginosa* (Shlaes, 2017) ، تقاربت النتيجة مع دراسة في مصر كانت فيها نسبة المقاومة (21.3%) للمضاد ذاته وأوضح الباحثون ان الكولستين هو خيار علاجي أخير لبكتيريا *P.aeruginosa* المقاومة للأدوية المتعددة (Lim et al., 2015).

الجدول 3-4: اختبار حساسية بكتيريا *P. aeruginosa* المعزولة من إصابات الأذن

| رقم العزلة | المضاد الحيوي                | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 | S11 |
|------------|------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|
| 1.         | Ticarcillin                  | S  | R  | R  | R  | R  | R  | R  | R  | R  | R   | R   |
| 2.         | Ticarcillin /clavulanic acid | S  | R  | R  | R  | R  | R  | R  | R  | R  | R   | R   |
| 3.         | Piperacillin                 | R  | R  | R  | R  | R  | R  | R  | R  | R  | R   | R   |
| 4.         | Ceftazidime                  | S  | R  | R  | S  | R  | R  | R  | R  | R  | R   | R   |
| 5.         | Cefepime                     | S  | R  | R  | S  | R  | R  | R  | R  | R  | R   | R   |
| 6.         | Imipenem                     | R  | R  | S  | S  | R  | R  | R  | R  | R  | R   | R   |
| 7.         | Meropenem                    | I  | R  | S  | S  | R  | R  | R  | R  | R  | R   | R   |
| 8.         | Amikacin                     | S  | R  | R  | R  | R  | R  | R  | R  | R  | R   | R   |
| 9.         | Gentamicin                   | S  | R  | R  | R  | R  | R  | R  | R  | R  | R   | R   |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                                 |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------------------------------|-----|
| R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | S   | Tobramycin                      | 10. |
| R   | R   | R   | R   | R   | S   | R   | S   | R   | R   | S   | Ciprofloxacin                   | 11. |
| R   | S   | S   | S   | R   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | Colistin                        | 12. |
| S22 | S21 | S20 | S19 | S18 | S17 | S16 | S15 | S14 | S13 | S12 | رقم العزلة<br>المضاد الحيوي     | ت   |
| R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | Ticarcillin                     | 1.  |
| R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | Ticarcillin<br>/clavulanic acid | 2.  |
| S   | S   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | Piperacillin                    | 3.  |
| R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | Ceftazidime                     | 4.  |
| R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | Cefepime                        | 5.  |
| R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | Imipenem                        | 6.  |
| R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | Meropenem                       | 7.  |
| S   | S   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | S   | R   | Amikacin                        | 8.  |
| R   | R   | R   | R   | R   | R   | S   | R   | S   | R   | R   | Gentamicin                      | 9.  |
| S   | S   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | Tobramycin                      | 10. |
| R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | S   | Ciprofloxacin                   | 11. |
| S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | Colistin                        | 12. |
|     |     |     | S30 | S29 | S28 | S27 | S26 | S25 | S24 | S23 | رقم العزلة<br>المضاد الحيوي     | ت   |
|     |     |     | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | Ticarcillin                     | 1.  |
|     |     |     | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | Ticarcillin<br>/clavulanic acid | 2.  |
|     |     |     | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | Piperacillin                    | 3.  |
|     |     |     | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | Ceftazidime                     | 4.  |
|     |     |     | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | Cefepime                        | 5.  |
|     |     |     | R   | R   | R   | R   | R   | S   | R   | R   | Imipenem                        | 6.  |
|     |     |     | R   | R   | R   | R   | R   | S   | R   | S   | Meropenem                       | 7.  |
|     |     |     | R   | R   | S   | R   | S   | R   | R   | R   | Amikacin                        | 8.  |
|     |     |     | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | Gentamicin                      | 9.  |

|          |          |          |          |          |          |          |          |               |     |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|---------------|-----|
| <b>R</b> | <b>R</b> | <b>R</b> | <b>S</b> | <b>R</b> | <b>R</b> | <b>R</b> | <b>R</b> | Tobramycin    | 10. |
| <b>R</b> | <b>R</b> | <b>R</b> | <b>R</b> | <b>R</b> | <b>R</b> | <b>R</b> | <b>R</b> | Ciprofloxacin | 11. |
| <b>R</b> | <b>S</b> | <b>S</b> | <b>S</b> | <b>S</b> | <b>S</b> | <b>R</b> | <b>S</b> | Colistin      | 12. |

R:Resistance

S:Sensitive

I:Intermediate



#### ٦-٤: الكشف المظهري لبعض عوامل الضراوة في الزائفة الزنجارية (Phenotypic detection for some virulence factors in *P. aeruginosa*)

##### ١-٦-٤: إنتاج صبغة البايوسيانين (Pyocyanin Pigment Production)

تمت دراسة إنتاج صبغة البايوسيانين لثلاثين عزلة من بكتيريا *P. aeruginosa* على الأوساط الزرعية المختلفة (وسط اكار الدم، وسط الاكار المغذي، وسط مولر هنتون، وسط اكار الماكونكي، وسط اكار السترمايد).

أوضحت النتائج أن أعلى نسبة هي ٨٠% (24 عزلة) لإنتاج البايوسيانين على وسط اكار السترمايد ، أثبتت دراسة في مصر أن استخدام السترمايد كمصدر للكربون أدى إلى تحسين إنتاجية الصبغة بشكل كبير (Abdelaziz et al., 2023). وفي دراسة أكدت على أن الصبغة الأساسية المنتجة على وسط السترمايد هي صبغة البايوسيانين (Sami Kassob, 2023) ، تليها إنتاج الصبغة على وسط اكار مولر هنتون حيث كانت ٢٠ عزلة منها قادرة على إنتاج صبغة البايوسيانين أي بنسبة 66.67%. وتطابقت هذه النتيجة مع دراسة في الهند (Jayaprakash and Ummer, 2016). من ناحية أخرى ، كانت ١٢ (٤٠%) عزلة منتجة للصبغة على وسط الاكار المغذي، إذ تقاربت هذه النتيجة مع دراسة سابقة كانت نسبة إنتاج البايوسيانين على نفس الوسط (38.14%) (Javadikasgari et al., 2018) ، سجلت الدراسة الحالية انخفاض إنتاج الصبغة على وسط اكار الدم ووسط اكار الماكونكي بواقع ٨ (26.67%) عزلة وفقاً للجدول (٤-٤). أثبتت دراسة أن إنتاج البايوسيانين يتأثر بمصادر الكربون والنيتروجين في وسط النمو والرقم الهيدروجيني والتهوية ومدة الحضان (Özcan and Kahraman, 2015) ، كما أشار باحثان في دراستهما أن السلالات المنتجة للبايوسيانين أكثر مقاومة للعديد من المضادات الحيوية من السلالات غير المنتجة (Muller and Merrett, 2014).

الجدول ٤-٤ : إنتاج صبغة البايوسيانين على الأوساط الزرعية المختلفة:

| Cetrimide Agar | Mueller Hinton Agar | Nutrient Agar | MacConkey agar | blood agar  | الأوساط الزرعية<br>العزلات |
|----------------|---------------------|---------------|----------------|-------------|----------------------------|
| 24 (80%)       | 20 (66.67%)         | 12 (40%)      | 8 (26.67%)     | 8 (26.67%)  | إنتاج الصبغة               |
| 6 (20%)        | 10 (33.33%)         | 18 (60%)      | 22 (73.33%)    | 22 (73.33%) | عدم إنتاج الصبغة           |
| 30 (100%)      |                     |               |                |             | المجموع لكل عذلة           |

#### ٤-٦-٢: إنتاج إنزيم البروتياز (Production of protease)

فحصت جميع عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* قيد الدراسة بحثاً عن نشاط التحلل البروتيني باستخدام طريقة الفحص على أطباق اكار الحليب Skim milk agar إذ أعطت 23 (76.67%) عذلة نتيجة موجبة مقابل 7 (23,33%) عزلات غيرمنتجة للبروتياز، في العديد من الدراسات السابقة نلاحظ ارتفاع نسبة العزلات المنتجة للبروتياز، إذ أظهرت دراسة أن 92,2% من عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* ذات قابلية على إنتاج البروتياز على اكار الحليب (Shawkat, 2022). وجد آخرون أن معظم العزلات السريرية 93% كانت قادرة على إنتاج البروتياز (Önal et al., 2015). فإن البروتياز المفرز من البكتيريا المسببة للأمراض يستخدم كعامل ضراوة مهم، مما يساعدها على استعمار الجلد، من هذا الموقع الأولي للاستعمار، يمكن أن تنتشر مسببات الأمراض إلى طبقات أعمق من الجلد، مما قد يؤدي إلى انتشار العدوى (Koziel and Potempa, 2013).

#### ٣-٦-٤ : إنتاج الهيمولاييسين (Hemolysin production)

تمَّ اختبار قدرة عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* المعزولة من إصابات الأذن المختلفة على إنتاج الهيمولاييسين عن طريق زراعتها على وسط اكار الدم الذي يحتوي (٣-٥) % من دم الإنسان، وقد وجدَ أن اغلب عزلات هذه البكتيريا كانت قادرة على إحداث تحلل كامل للدم ( $\beta$ -hemolysis) والبالغ عددها ٢٠ (٦٦,٦٧%) عزلة ، بينما كانت ١٠ (٣٣,٣٣%) عزلات لم تظهر أي منطقة من انحلال الدم حول المستعمرات ( $\gamma$ - hemolysis) ، تتقارب هذه النتيجة مع دراسة سابقة في مصر كانت عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* المعزولة من إصابات سريرية مختلفة قادرة على إنتاج الهيمولاييسين بنسبة ٧٤% (El Edel et al., 2023). تفاوتت هذه النتيجة مع دراسة أجريت في الهند أعطت العزلات انحلال كامل للدم بنسبة ٨٨% واستنتج الباحثون أن الهيمولاييسين أحد عوامل الضراوة التي تشارك في المقاومة المتعددة والشاملة للمضادات الحيوية في بكتيريا الزائفة الزنجارية (Pramodhini et al., 2016).

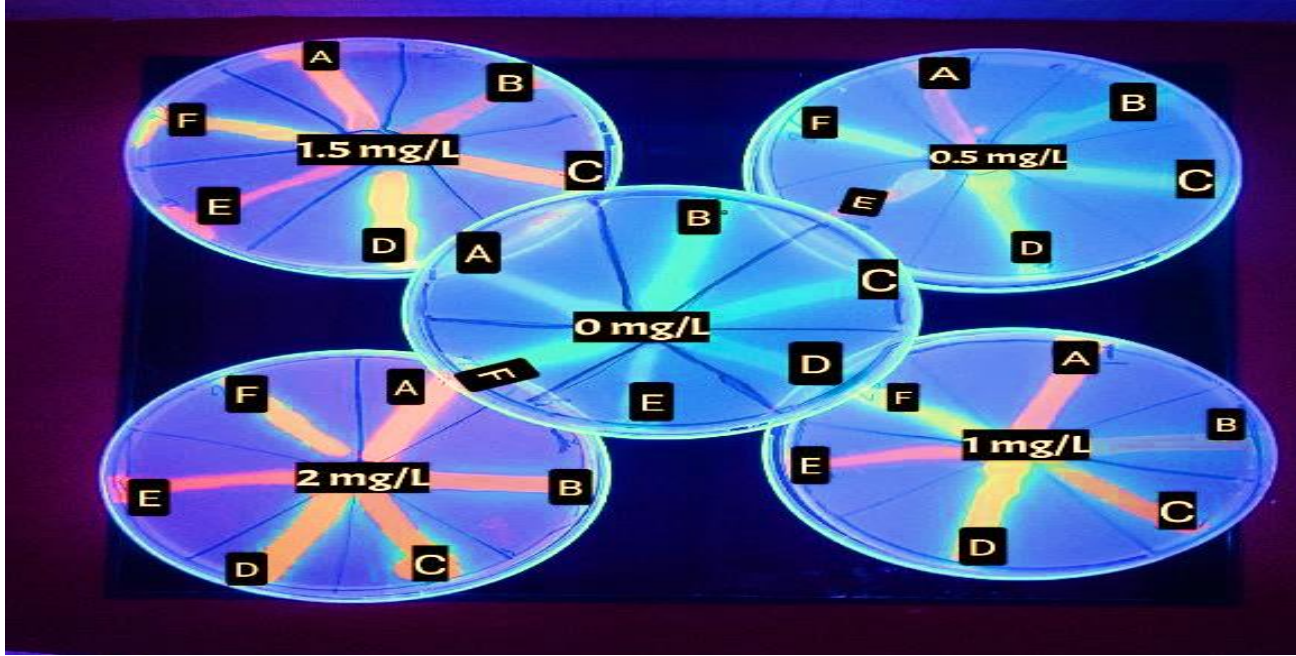
يلعب إنتاج انحلال الدم بيتا بوساطة *P. aeruginosa* دورًا مهمًا في نشر العدوى ، وغزو هذا الكائن الممرض للخلايا حقيقية النواة، نظرًا لأن هذه السموم تشكل ثقب على أغشية الخلايا مما يحمي البكتيريا من آليات دفاع المضيف ومن تأثير المضادات الحيوية (Friedman et al., 2002).

#### ٤-٦-٤ : الكشف المظهري عن مضخات التدفق (Phenotypic Detection Of Efflux Pump)

أجري الكشف عن مضخات التدفق في ٣٠ عزلة بكتيرية تعود لبكتيريا *P. aeruginosa* باستخدام طريقة العجلة-اكار بروميد الإثيديوم (Ethidium Bromide-Agar Cartwheel) كدليل للكشف المظهري، كشفت النتائج أن ٢٣ (٧٦.67%) عزلة بكتيرية كانت إيجابية للكشف المظهري. تمَّ الاعتماد في ذلك على أدنى تركيز لم تظهر فيه العزلات تآلق تحت مصدر الأشعة فوق البنفسجية (UV) كما هو موضح في الشكل 2-4 .

تتوافق هذه النتائج مع دراسة محلية أظهرت أن ٧٦,٧% من العزلات إيجابية لاختبار مضخات التدفق وأن جميع العزلات كانت مقاومة للكولستين (Al Marjani et al., 2015) ، أشار باحثون آخرون إلى أن مضخات التدفق تلعب دورًا في اكتساب بكتيريا *P. aeruginosa* صفة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية

عن طريق التآزر بين الغشاء الخارجي منخفض النفاذية ، والتعبير عن عدد من أنظمة تدفق المضادات الحيوية المتعددة ، بما في ذلك MexAB-OprM (Li et al., 2015).



الشكل ٤-٢ : طريقة العجلة -أكار بروميد الإثديوم (EtBr) لقياس نشاط مضخات التدفق، يشير التآلق الإيجابي إلى تدفق سلبي (العزلة A) بينما يشير التآلق السلبي إلى تدفق إيجابي (العزلات B, C, D, E, and F).

#### ٤-٦-٥: الكشف عن قدرة بكتيريا الزنافة الزنجارية على تكوين الأغشية الحيوية (Detection of biofilm formation among *Pseudomonas aeruginosa*)

من عوامل الضراوة المهمة للبكتيريا التي تنتجها هو تكوين الأغشية الحيوية ، إذ يمثل الخطوة الأولى في بدء الالتهاب وحدوث المرض، لأنه يوفر الحماية الذاتية للبكتيريا ضد الخلايا البلعمية وبالتالي تستمر الإصابة وتزداد قدرة البكتيريا على مقاومة المضادات الحيوية (Balcázar et al., 2015).

تمّ التحري عن قدرة عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* على تكوين الأغشية الحيوية باستخدام طريقة الأنابيب ( Tubes method ) ، وهو اختبار نوعي للكشف عن قابلية على تكوين الأغشية الحيوية على أساس كثافة وسمك الأغشية الحيوية المرتبطة بجدار أنبوبة الاختبار. تكون النتيجة موجبة عندما تتشكل الأغشية الحيوية على شكل طبقة بنفسجية على الجدران الداخلية وأسفل أنابيب الاختبار، ويتضح من الجدول 4-5 نتائج الدراسة الحالية أن بكتيريا *P. aeruginosa* قادرة على إنتاج الأغشية الحيوية بنسبة ١٠٠%، توزعت قوة الإنتاج

للغشاء الحيوي بين العزلات، إذ كان بعضها ذات إنتاج قوي (Strong Biofilm Formation SBF)، وقسم منها متوسطة (Moderate Biofilm Formation MBF) وأخرى ضعيفة الإنتاج (Weak Biofilm Formation, WBF)، تمَّ تحديد ٦ (٢٠%) عزلات كانت قوية الإنتاج، وأخرى متوسطة بواقع ٨ (26.67%) عزلات، و ١٦ (53.33%) عزلة ضعيفة الإنتاج.

لتأكيد النتائج أعلاه، تمَّ استخدام طريقة صفائح المعايرة الدقيقة (microtiter plate method) وهو اختبار كمي لكشف قابلية بكتيريا *P.aeruginosa* على تكوين الأغشية الحيوية، حيث يعطي قيمة للامتصاص عند طول موجي قدره (٦٣٠) نانوميتر باستخدام جهاز قارئ ELISA لتحديد كمية الأغشية الحيوية المتكونة من بعد الالتصاق على أسطح صفائح المعايرة، تمثل قيم الامتصاص سمك الأغشية الحيوية التي تنتجها العزلات البكتيرية، تعدُّ هذه طريقة قياسية وهي أكثر دقة وحساسية من طريقة الأنابيب (Kord et al. 2018).

بينت نتائج الاختبار الكمي في الدراسة الحالية أن جميع عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* ذو قابلية على إنتاج الأغشية الحيوية، من بين هذه العزلات، كانت ١٢ (٤٠%) عزلة ذات إنتاج قوي للأغشية الحيوية وأخرى متوسطة الإنتاج بواقع ١٥ (٥٠%) عزلة، بينما كانت 3 (10%) عزلات ضعيفة الإنتاج (الجدول 4-5).

كشفت إحدى الدراسات أن الطريقة الكمية كانت أكثر كفاءة من الطريقة النوعية إذ كانت نتائج الطريقة النوعية أن ١٥% فقط من العزلات تُعدُّ منتجة للأغشية الحيوية، بينما كشفت الطريقة الكمية أن ٧٥% من العزلات كانت منتجة لتلك الأغشية (Da Costa Lima et al., 2017).

النتيجة التي تم الحصول عليها من هذه الدراسة متسقة مع العديد من الدراسات، بما في ذلك دراسة محلية في بغداد، حيث كانت بكتيريا *P. aeruginosa* المعزولة من إصابات الأذن هي الأكثر ارتباطاً بتكوين الأغشية الحيوية وبنسبة ١٠٠% إذ يزيد تكوين الأغشية الحيوية من الإصابة بالتهاب الأذن الوسطى (Alwan et al., 2021). كما تتفق نتائج الدراسة الحالية أيضاً مع دراسة بلغت فيها قابلية بكتيريا *P.aeruginosa* المعزولة من العينات السريرية على تكوين أغشية حيوية بنسبة ١٠٠% (٦٠% ضعيفة الإنتاج، ٢٥,٩% متوسطة الإنتاج و ١٤,١% ذات إنتاج قوي) (Perez et al., 2013). وفي حين أنها غير متوافقة مع دراسة آخرين في مصر إذ تمَّ اختبار قابلية عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* من مصادر سريرية على تكوين الأغشية الحيوية باستخدام الطريقة الكمية. كانت العزلات منتجة للأغشية الحيوية القوية والمتوسطة والضعيفة بنسبة ٨٠%، ١٠% و ١٠% على التوالي (Seiffen and Ali, 2021).

| الطريقة النوعية  |       | الطريقة الكمية   |       | العزلات المنتجة للغشاء الحيوي |
|------------------|-------|------------------|-------|-------------------------------|
| النسبة المئوية % | العدد | النسبة المئوية % | العدد |                               |
| 40               | 12    | 20               | 6     | قوية الإنتاج                  |
| 50               | 15    | 26.67            | 8     | متوسطة الإنتاج                |
| 10               | 3     | 53.33            | 16    | ضعيفة الإنتاج                 |

الجدول 4-5: توزيع بكتيريا *P. aeruginosa* بحسب انتاجها للغشاء الحيوي باستخدام الطريقتين النوعية والكمية

#### ٧-٤: العلاقة بين تكوين الأغشية الحيوية ومقاومة المضادات الحيوية (Relationship between biofilm formation and antibiotic resistance)

يتضح من خلال ملاحظة الشكل ٤-٣ ظهور مقاومة مشتركة بين العزلات ذات الإنتاج القوي والمتوسط لكل من Ticarcillin ، Ticarcillin /clavulanic acid ، Cefepime، Ceftazidime وبنسبة ١٠٠% بينما انخفضت المقاومة في العزلات ضعيفة الإنتاج للغشاء الحيوي إلى 66.67% لكل من Ticarcillin ، Ticarcillin /clavulanic acid ، Ceftazidime و ٣٣,٣٣% لمضاد Cefepime.

وكان هناك تفاوت واضح لسبعة مضادات Amikacin، Meropenem، Imipenem ، Piperacillin، Ciprofloxacin، Gentamicin و Tobramycin إذ ارتفعت نسبة المقاومة في العزلات ذات الإنتاج القوي للغشاء الحيوي وبنسبة ١٠٠% لجميع المضادات المذكورة وكانت جميع العزلات حساسة (١٠٠%) لمضاد Colistin.

ومن ملاحظة الشكل ذاته نجد أن العزلات متوسطة الإنتاج للغشاء الحيوي مقاومة وبنسبة ٨٦,٦٧% لكل من Ciprofloxacin، Piperacillin، Gentamicin، Meropenem وبنسب (٦٦,٦٧، ١٣,٣٣، ٨٠ و ٩٣,٣٣) % للمضادات Imipenem، Tobramycin، Amikacin، Colistin على التوالي.

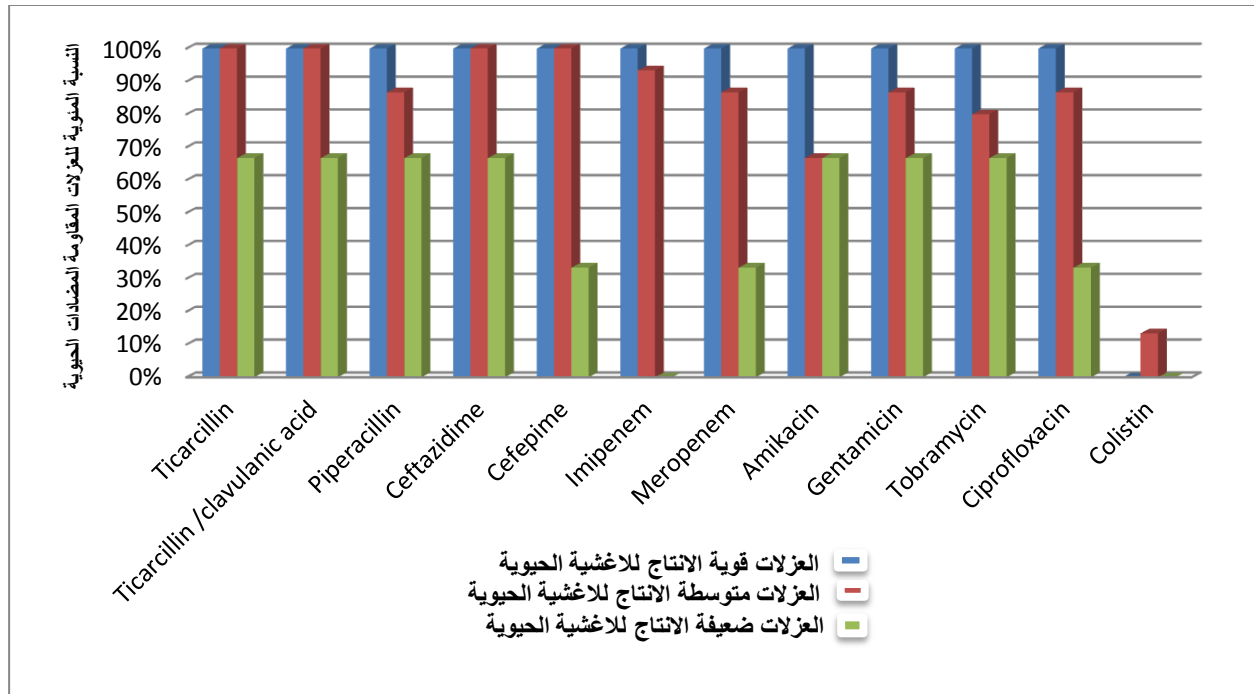
أما فيما يخص العزلات ضعيفة الإنتاج فقد انخفضت المقاومة إلى ٦٦,٦٧% لكل من Amikacin، Tobramycin، Gentamicin وبنسبة ٣٣,٣٣% لكل من المضادين Ciprofloxacin و Meropenem في حين كانت البكتيريا حساسة لكل من Colistin و Imipenem وبنسبة ١٠٠%.

شكلت العزلات المقاومة للأدوية المتعددة في دراسة محلية نسبة 90.9% من العزلات شديدة الالتصاق، تليها العزلات متوسطة الالتصاق ٧٦% والعزلات ضعيفة الالتصاق ٧,٧% (Namuq et al., 2019) وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية.

أشارت إحدى الدراسات إلى أن تكوين الغشاء الحيوي القوي كان مرتبطاً بقوة مع المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية (Karami et al., 2019) ، وفي دراسة أخرى كانت ٤٦,٨% من العزلات المقاومة للأدوية المتعددة ذات إنتاج قوي للأغشية الحيوية (Karami et al., 2020).

وفي دراسة محلية كانت جميع العزلات (١٠٠%) منتجة للأغشية الحيوية، معظمها ذات المقاومة للكاربابينيمات وقد لوحظت أعلى نسبة لمقاومة للميروبيينيم، في العزلات ذات إنتاج قوي للأغشية الحيوية (AI-) (Mohammed and Mahmood, 2024).

تلعب الأغشية الحيوية دوراً حاسماً في انتشار مقاومة المضادات الحيوية من خلال عدة عوامل منها تفاعل مصفوفة الأغشية الحيوية مع المضادات الحيوية التي يمكن أن تؤخر أو تقلل نشاطها (Pinto et al., 2020)، كما تنتج البكتيريا الموجودة داخل الأغشية الحيوية خلايا ثابتة خاملة من الناحية الأيضية وهي إحدى آليات الهروب من المضادات الحيوية فضلاً عن قابليتها على البقاء في تراكيز عالية من المضادات الحيوية (Wood et al., 2013). في البكتيريا المكونة للأغشية الحيوية، هناك معدل مرتفع من الطفرات التي تمكنها من تطوير آليات مقاومة، وهذا بدوره يعطي فرصة لجيناتها لإنتاج إنزيمات تعطل المضادات الحيوية أو تطرد المضادات الحيوية باستخدام مضخات التدفق (Ciofu and Tolker-Nielsen, 2019) ، أن أعداد الكائنات الحية الدقيقة داخل المصفوفة كثيفة للغاية بحيث يكون هناك اتصال وثيق بين الكائنات الحية الدقيقة المختلفة التي تمكنها من تبادل جينات المقاومة وفي النهاية قد يكتسب المجتمع بأكمله هذا الجين المقاوم (Balcázar et al., 2015) .



الشكل ٤-٣: توزيع مقاومة المضادات الحيوية في العزلات المنتجة للأغشية الحيوية

#### ٤-٨: انتشار عوامل الضراوة المختلفة وارتباطها بمقاومة المضادات الحيوية (Prevalence of different virulence factors and their association with antibiotic resistance)

أتضح من نتائج هذه الدراسة أن عامل الضراوة الأكثر شيوعاً هو تكوين الأغشية الحيوية، إذ كانت جميع العزلات (30) ذات قابلية على تكوين هذه الأغشية. أظهرت ١٩ عزلة مقاومة شديدة للمضادات (XDR) و٦ عزلات مقاومة شاملة للمضادات (PDR) و٥ عزلات مقاومة متعددة للمضادات (MDR) الشكل ٤-٤ ، وكانت هذه النتائج متوافقة مع دراسة سابقة كانت فيها XDR أكثر تردداً مقارنة مع MDR و PDR (Ali et al., 2021).

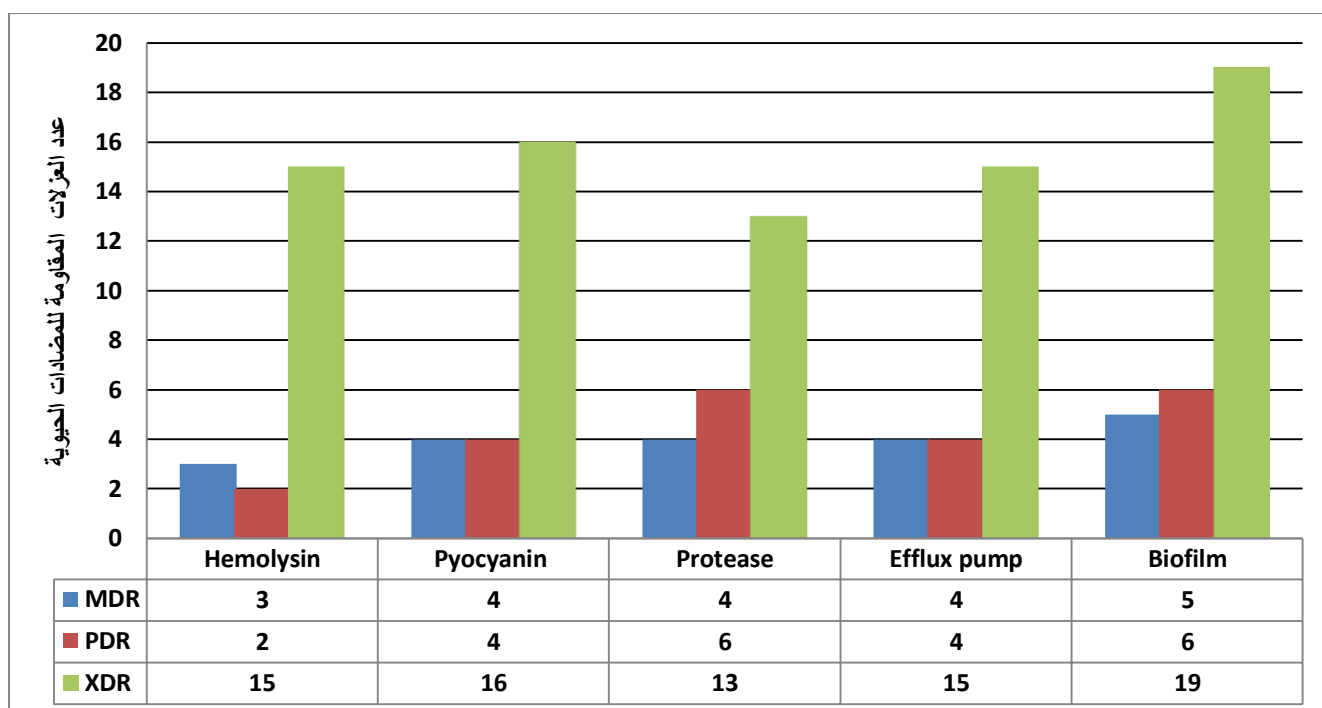
أشارت دراسات أخرى أنّ إنتاج الأغشية الحيوية من الخصائص الرئيسية لبكتيريا *P. aeruginosa* التي تمكن هذه البكتيريا من التسبب في حالات الإصابات المزمنة وزيادة المقاومة للمضادات الحيوية (Thi et al., 2020).

على العكس من ذلك، كان البروتيبوز هو عامل الضراوة الأقل انتشاراً وأظهرت مجموعة XDR نشاطاً أعلى مقارنة بسلاسل PDR و MDR إذ بلغت العزلات التي انتجت البروتيبوز ٦،١٣ و٤ عزلة على التوالي ، وهذا



يتفق مع النتائج التي توصلت إليها دراسة في الهند وأوضحت تلك الدراسة أن إنتاج البروتين كان له دور في زيادة ضراوة السلالات المقاومة وأظهرت مجموعة XDR نشاطاً أعلى مقارنة بسلالات (Naik et MDR . al., 2021).

علاوة على ذلك، كان الهيمولاييسين والبايوسيانين ومضخات التدفق من عوامل الضراوة المهمة في العزلات قيد الدراسة، إذ ارتفع إنتاجها في سلالات XDR مقارنة بالسلالات الأخرى. وبالمثل، كشف باحثون آخرون أن إنتاج هذه العوامل بواسطة *P. aeruginosa* قد انخفض في سلالات MDR، وارتفع في سلالات XDR (Rodulfo et al., 2019).



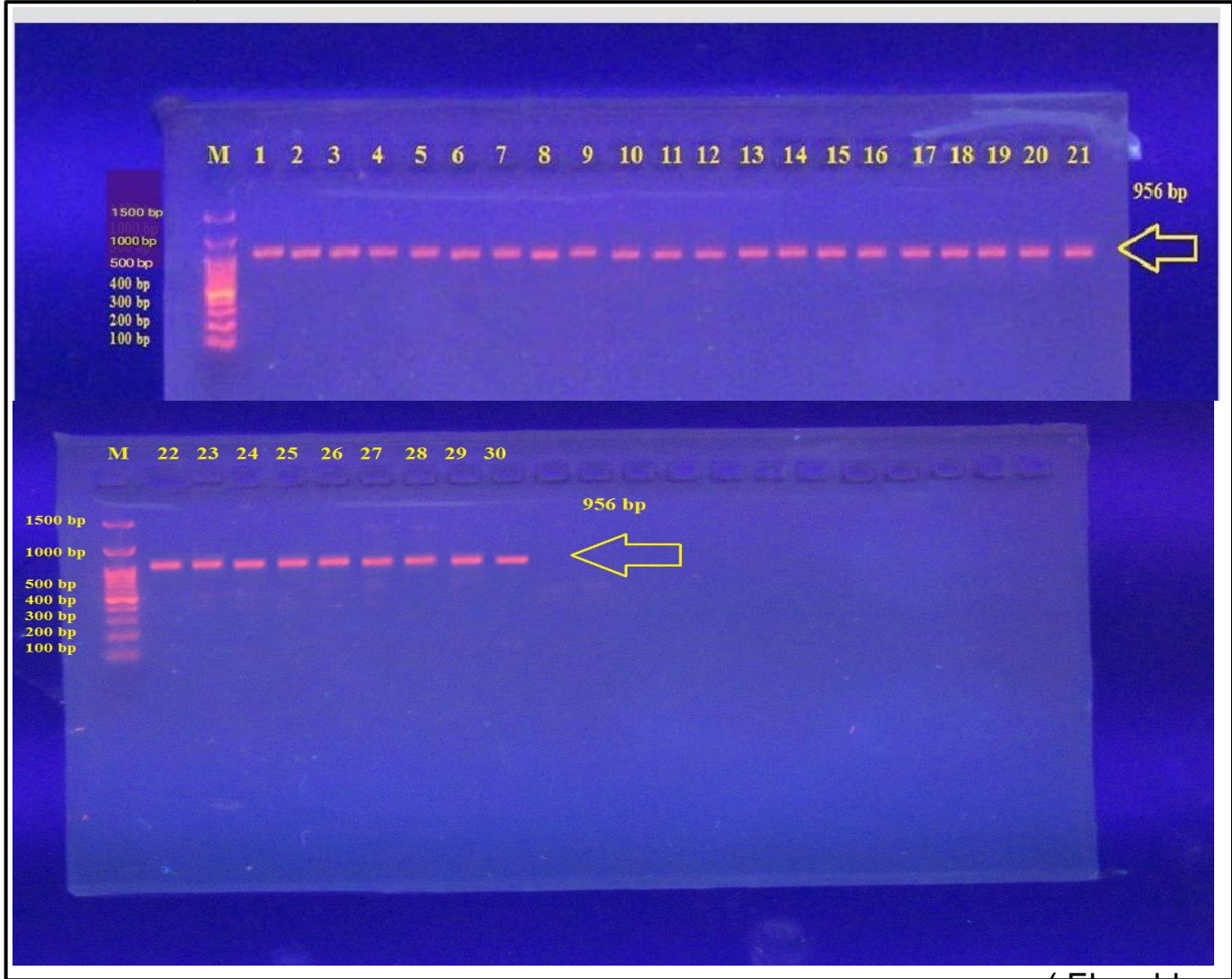
الشكل ٤-٤: توزيع عوامل الضراوة في بكتيريا *P. aeruginosa* وارتباطها بمقاومة المضادات الحيوية

#### ٩-٤: التوصيف الجزيئي لبكتيريا الزائفة الزنجارية (Molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa*)

##### ١-٩-٤: الكشف الجزيئي عن جين الرنا الرايبوسومي 16S (16S ribosomal RNA gene)

للكشف عن وجود الجين التشخيصي 16S rRNA في بكتيريا *P. aeruginosa*، استخدمت تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) إذ يُعدُّ هذا الجين من الجينات المهمة، وهو

ما يمثل جزءًا ثابتًا من الشفرة الوراثية ، إذ يمكن من خلاله تحديد العوامل الوراثية للبكتيريا ( Bacterial genetic factors ) ، التي يمكن تمييز بوصفها بكتيريا *P.aeruginosa* عن باقي الأنواع الأخرى (Altaai et al., 2014) أظهرت نتائج الكشف الجزيئي أن جميع عزلات بكتيريا *P.aeruginosa* تحمل هذا الجين الذي يبلغ حجمه ٩٥٦ زوجًا قاعديًا، كما هو مبين في الشكل 4-5 ، وقد اتفقت هذه النتائج مع دراسة أخرى أكدت أن جميع عزلات بكتيريا *P.aeruginosa* التي تم تشخيصها بالطرائق التقليدية تحمل جين *16S rRNA* وبنسبة ١٠٠% مما يؤكد كفاءة طريقة PCR في الكشف عن جين المذكور ( *et al.*, ٢٠٢١ )



. ( El-sadda

الشكل ٤-٥: الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لبكتيريا *P. aeruginosa* المعزولة من إصابات الأذن باستعمال البادئ لجين *16S rRNA* (٩٥٦ زوج قاعدي) بتركيز هلام الاكاروز (١,٥ %) و فرق جهد (٥٠ فولت) لمدة ساعة واحدة.

#### ٤-٩-٢: الكشف الجزيئي عن جينات تكوين الأغشية الحيوية (Molecular detection of biofilm forming genes)

بعد إجراء الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز، تمت مقارنة الأوزان الجزيئية للحزم المضيفة الناتجة مع الدليل الحجمي. أوضحت نتائج الكشف ان ٧ (23.٣٣%) عزلات تحتوي على جين *psIA* بحجم ١١٩ زوج قاعدي (الشكل ٤-٦) بينما كانت نصف العزلات (٥٠%) تحتوي على جين *psID* بحجم ٣٦٩ زوجًا قاعديًا (الشكل ٤-٧).

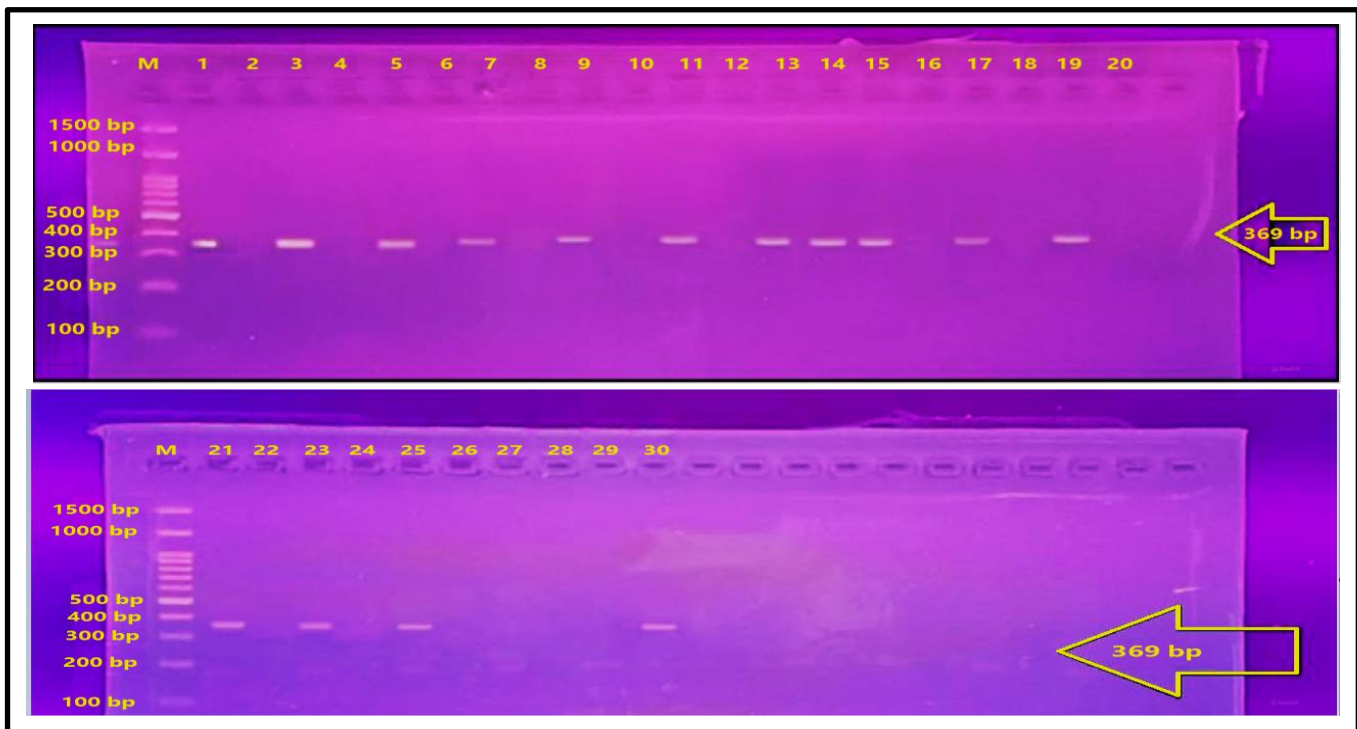
في دراسة حديثة، أكتشفت أن ٣٦,٦% من عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* تحمل جين *PsID*، وأكدت هذه الدراسة أن السلالات البكتيرية التي تحمل الجينات المشفرة لتكوين الأغشية الحيوية لديها القابلية على التسبب في إصابات حادة ونتيجة لذلك، فإن القضاء على هذه العزلات أمر صعب ويستغرق وقتاً طويلاً مما يشكل انتشار هذه العزلات بين السكان تهديداً للصحة العامة (Rajabi et al., 2022). أيضاً تقاربت نتائج الدراسة الحالية مع Hou et al (٢٠١٢) إذ تحتوي ٣١,٠٣% من عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* على جين *psIA* واقترحوا دوراً مهماً لجين *psIA* في بدء تشكيل الأغشية الحيوية (Hou et al., 2012).

على الرغم من ذلك ذكرت دراسات أخرى أن جميع عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* المعزولة من حالات سريرية لا تحتوي على جين *psIA* (1119 زوجًا قاعديًا) ، إلا أن غياب هذا الجين لم يستبعد إنتاج الأغشية الحيوية بوساطة هذه البكتيريا نتيجة مشاركة العديد من الجينات في تكوين الأغشية الحيوية (Raksha et al., 2020; El Naghy et al., 2020).

تختلف نتائج الدراسة الحالية عن دراسة إيرانية أتضح فيها أن معدل انتشار *psIA* و *psID* كان (58%) و(60%) على التوالي وكشفت هذه الدراسة أن وفرة الجينات المنظمة للأغشية الحيوية في *P. aeruginosa* تتأثر بإنزيمات  $\beta$ -lactamase المختلفة (Porbaran and Habibipour, 2020).



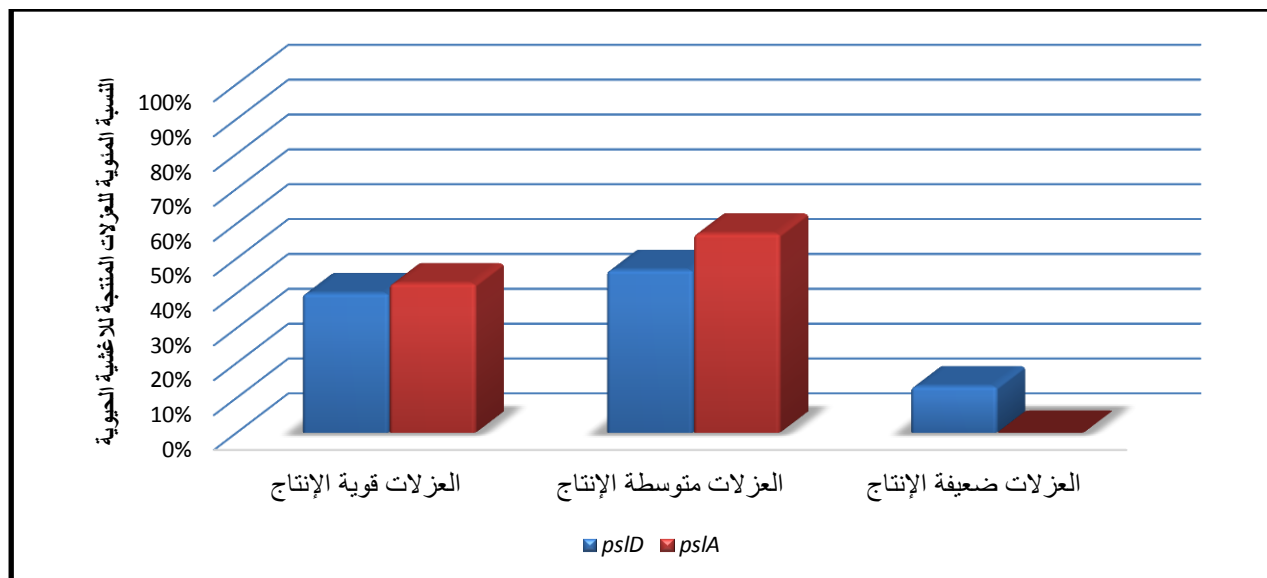
الشكل ٤-٦: الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لبكتيريا *P. aeruginosa* المعزولة من إصابات الأذن باستخدام البادئ لجين *PsIA* (١١١٩ زوج قاعدي) بتركيز هلام الاكاروز (١,٥%) وفرق جهد (٥٠ فولت) لمدة ساعة واحدة.



أوضحت نتائج الفحص المظهري أن جميع عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* منتجة للأغشية الحيوية، مع ذلك كانت نتائج الكشف الجزيئي لجين *pslD* في العزلات متوسطة الإنتاج للأغشية الحيوية (٧٤٦,٦٧%) عزلات مقارنة بمجموعة العزلات ضعيفة الإنتاج (١٣,٣٣%) وقوية الإنتاج (٤٠%). على العكس من ذلك الشكل ٤-٧: الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لبكتيريا *P. aeruginosa* المعزولة من إصابات الأذن لم تحمل أي عزلة ضعيفة الإنتاج جين *pslA*، بينما اقتصر تواجد الجين على العزلات المتوسطة (٤٠٤,٥٧%) باستعمال البادئ لجين *pslD* (٢٦٩,٢٦%) ورواج قاعدي) بتركيز هلام الأكاروز (١,٥%) وقرق جهد (٥,٤ فولت) عزلات وقوية الإنتاج (٤٢,٨٦%) عزلات وكفاءة متوسطة وفلج الشكل ٤-٨.

كانت النتائج غير متوافقة مع النتائج التي توصلت إليها دراسة في نيجيريا كانت جميع عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* المنتجة للأغشية الحيوية تحمل جينات *pslA* و *pslD* بينما تمتلك العزلات المتوسطة وضعيفة الإنتاج هذه الجينات بنسب مختلفة وأشارت الدراسات أن جينات *pslA* و *pslD*، تُعدُّ مكونات رئيسة لموضع بناء عديد السكاريد (*psl*) المسؤول عن إفراز السكاريد خارج الخلية في بكتيريا *P. aeruginosa* (Ugwuanyi et al., 2021).

تشير قدرة إنتاج الأغشية الحيوية على الرغم من غياب جينات الأغشية الحيوية التي تمت دراستها إلى محددات وراثية أخرى للأغشية الحيوية تساهم في تطوير مصفوفة الأغشية الحيوية في بكتيريا *P. aeruginosa*. وبالمثل، فإن غياب إنتاج الأغشية الحيوية بالطرائق المظهرية مع الكشف عن وجود جينات تكوين الأغشية الحيوية قد يكون بسبب طفرات كروموسومية، مما يؤثر على إنتاج البروتينات المرتبطة بالأغشية الحيوية (Müsken et al., 2010; Moradali et al., 2017).



الشكل ٤-٨: النمط المظهري والجزئي لتكوين الأغشية الحيوية

#### ٤-٩-٣: الكشف الجزيئي عن جينات المقاومة المرتبطة بالغشاء الحيوي (Molecular detection of biofilm-associated resistance genes)

تمّ الكشف في هذه الدراسة عن وجود جين *ndvB* الخاص ببكتيريا *P. aeruginosa* وبملاحظة الشكل ٤-٩ الذي يتبين من خلاله أن البادئ الخاص بالجين *ndvB* كان ناجحاً في تضخيم هذا الجين من خلال ظهور ناتج حجمه ١٥٧ زوجاً قاعدياً.

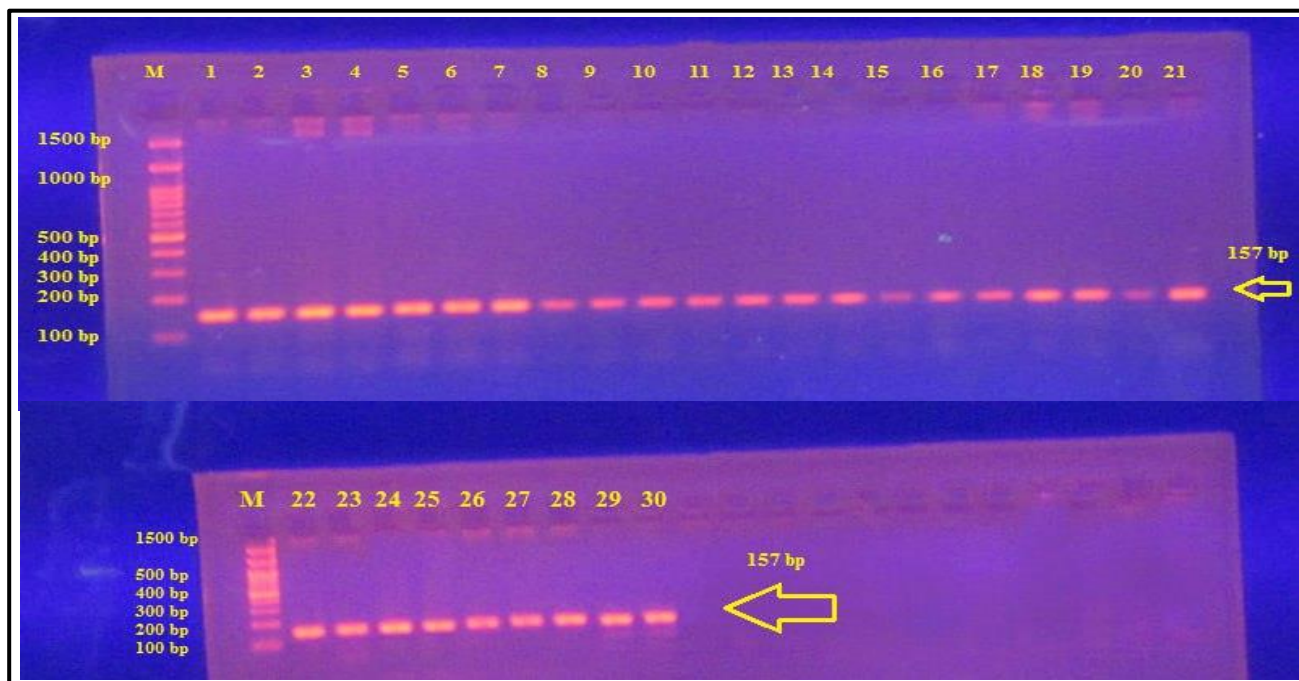
وبملاحظة الشكل ذاته يتضح أن جميع العزلات (١٠٠%) تمتلك جين *ndvB* والذي يمثل الجين المسؤول عن تكوين الكلوكان الذي يعمل على مقاومة المضادات الحيوية الخاصة بالأغشية الحيوية عن طريق عزل جزيئات المضادات الحيوية بعيداً عن أهدافها الخلوية (Beaudoin et al., 2012). يعد الكلوكان من الكربوهيدرات المشحونة بشحنة سالبة، والتي ترتبط بالأمينوكلايكوسيدات المشحونة بشحنة موجبة، والذي يوفر من خلاله ارتباطاً هيكلياً واضحاً بين إنتاج الأغشية الحيوية ومقاومة المضادات الحيوية (Sadovskaya et al., 2010).

تتطابق نتائج الدراسة الحالية مع نتائج دراسة محلية أجريت في بغداد، أظهر فيها الكشف الجزيئي لنفس الجين باستخدام تقنية PCR أن جميع العزلات (١٠٠%) تحتوي على جين *ndvB*، وهو المسؤول عن آلية

مقاومة المضادات المرتبطة في الأغشية الحيوية لبكتيريا *P. aeruginosa* (Ismail and Altaai, 2021)

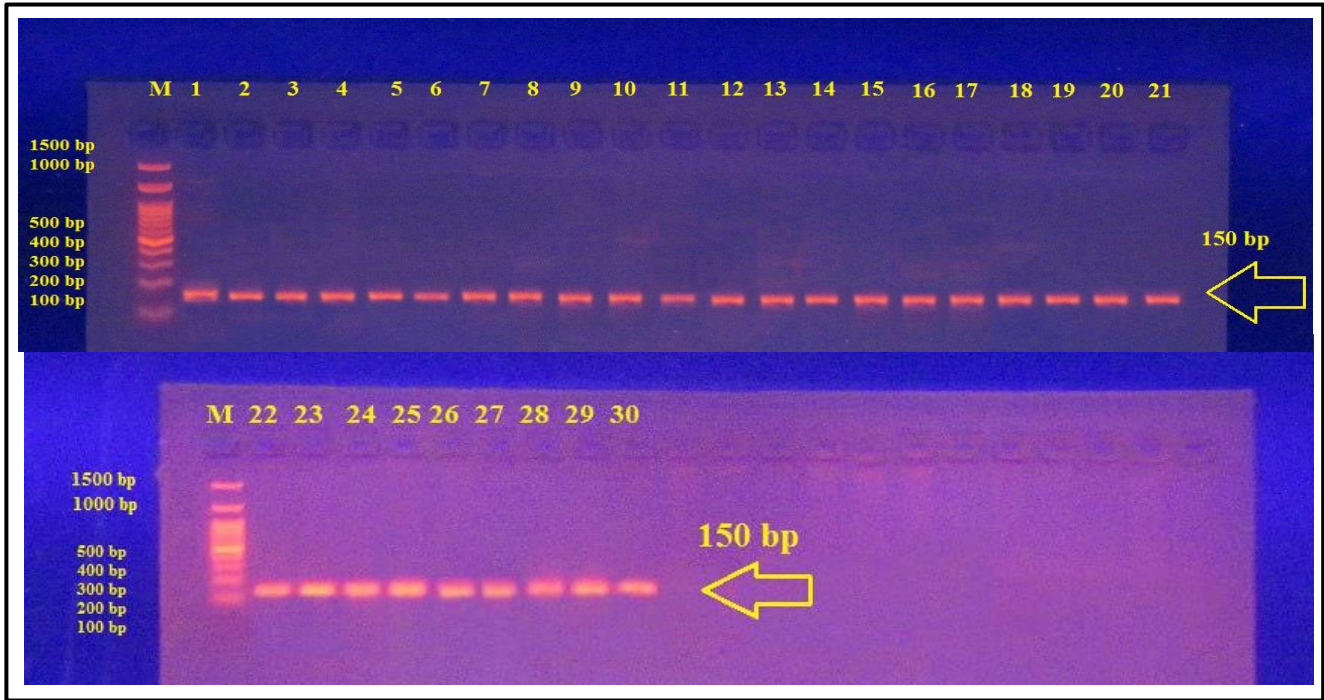
كما يساهم جين *tssC1* في تغيير بنية الغشاء الحيوي لجعله أقل نفاذية للمضادات الحيوية، الذي كشفت عنه دراستنا الحالية، وأفادت النتائج أن معدل انتشار جين *tssC1* كان ١٠٠% في العزلات المنتجة للأغشية الحيوية (الشكل ٤-١٠).

تقاربت نتائج الدراسة الحالية مع دراسة إيرانية كان فيها ٩٦,٧% و ٩٠,٢% من من عزلات بكتيريا *P.aeruginosa* قيد الدراسة تحمل جين *ndvB* و *tssC1* على التوالي ، وتوصلت تلك الدراسة إلى أن إنتاج الأغشية الحيوية كان أعلى بشكل ملحوظ بين عزلات بكتيريا *P.aeruginosa* المقاومة للمضادات المتعددة مقارنة بالعزلات الحساسة ربما يكون هذا بسبب تأخر تغلغل العوامل المضادة للميكروبات داخل الخلايا المكونة للغشاء الحيوي (Saffari et al., 2017).



الشكل ٤-٩: الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لبكتيريا *P. aeruginosa* المعزولة من إصابات الأذن باستعمال البادئ لجين *ndvB* (١٥٧ زوج قاعدي) بتركيز هلام الاكاروز (١,٥%) وفرق جهد (٥٠ فولت)

لمدة ساعة واحدة



#### 4-9-4: الكشف الجزيئي عن الجين *mex B* في نظام مضخات التدفق (Molecular detection of the *mexB* gene in the efflux pumps system)

كشفت هذه الدراسة عن وجود جين *mexB* في بكتيريا *P.aeruginosa* ، إذ أتضح من النتائج نجاح البادئ في تضخيم جين *mexB* بوجود ناتج بحجم ٢٤٤ زوج قاعدي ، ومن خلال ملاحظة الشكل ٤-١١ نلاحظ أن جين *mexB* موجود في ١٧ (٥٦,٦٧%) عزلة، ويُعدُّ هذا الجين أحد الجينات المشاركة في أنظمة الضخ والتي تساهم في مقاومة بكتيريا *P.aeruginosa* للمضادات الحيوية. تعود هذه الأنظمة إلى عائلة (RND) resistance-nodulation-division وتستخدم لضخ المضادات خارج الخلية البكتيرية ، مما يقلل من تركيز المضادات المستهدفة دون تعديل مكوناتها مقارنةً بآليات المقاومة الأخرى التي تعمل على تغيير الهدف أو المضاد لتعطيل فعاليته. (Yaseen and Ahmed, 2023).

الشكل ٤-١١: العذبة الترميز الجزيئي لنواتج تفاعل PCR لبكتيريا *P.aeruginosa* العزلة من إصابات الأذن من باستعمال البادئ لجين *tssCI* (٥٠ زوج قاعدي) بتركيز هلام الاكاروز (٥٠%) وفرق جهد (٥٠ فولت) لمدة إصابات الأذن ، ولكن بنسب مختلفة من مكان إلى آخر فقد بلغت نسبته 75% في مصر (El-Said et al., 2012) وبنسبة 65% في دراسة سابقة في إيران (Goli et al., 2016) وأكدت الدراسات أن الإفراط في



التعبير عن مضخات التدفق إحدى أهم الآليات التي تساهم في المقاومة الذاتية والمكتسبة للمضادات الحيوية في بكتيريا *P. aeruginosa*.

جاءت نتيجة الدراسة الحالية غير متوافقة مع دراسة محلية كان فيها جين *mexB* موجود بنسبة ١٠٠%. وأتضح أن أنظمة الضخ لها دور كبير في ضخ المركبات السامة من الخلايا منها الفلوروكينولونات (Fluoroquinolones)، وبروميد الإثيديوم (Ethidium bromide)، والكلورامفينيكول (Chloramphenicol)، والبيتا لاکتام ( $\beta$ -Lactams)، والتتراسايكلين (Tetracycline) مما يزيد من ضراوتها (Mohi-Aldeen et al., 2018).

كانت نتيجة الدراسة الحالية أعلى مما ورد في دراسات أخرى، إذ كانت نسبة تردد الجين ٣٦,٤%، وأتضح فيها إلى أن الإفراط في التعبير عن مضخة التدفق لا يبدو أنه الآلية الرئيسية لمقاومة المضادات بين العزلات السريرية لبكتيريا *P. aeruginosa*، ولكنهُ يمثل آلية مساعدة لمقاومة المضادات الحيوية وفسروا الارتباط بين الآليات المتميزة مثل تنظيم البورينات والإفراط في إنتاج انزيم AmpC، بالإضافة الى أنه يلعب دوراً مهماً في النمط المظهري للمقاومة المتعددة للمضادات الحيوية بين العزلات السريرية لبكتيريا *P. aeruginosa*. (Xavier et al., 2010).



الشكل ٤-١١: الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لبكتيريا *P. aeruginosa* المعزولة من إصابات الأذن باستعمال البادئ لجين *mexB* (٢٤٤ زوج قاعدي) بتركيز هلام الاكاروز (١,٥%) و فرق جهد (٥٠ فولت) لمدة ساعة واحدة.

#### ٤-١٠: دور مضخات التدفق في تشكيل الغشاء الحيوي ومقاومة المضادات الحيوية (The Role of efflux pumps in biofilm formation and antibiotics resistance)

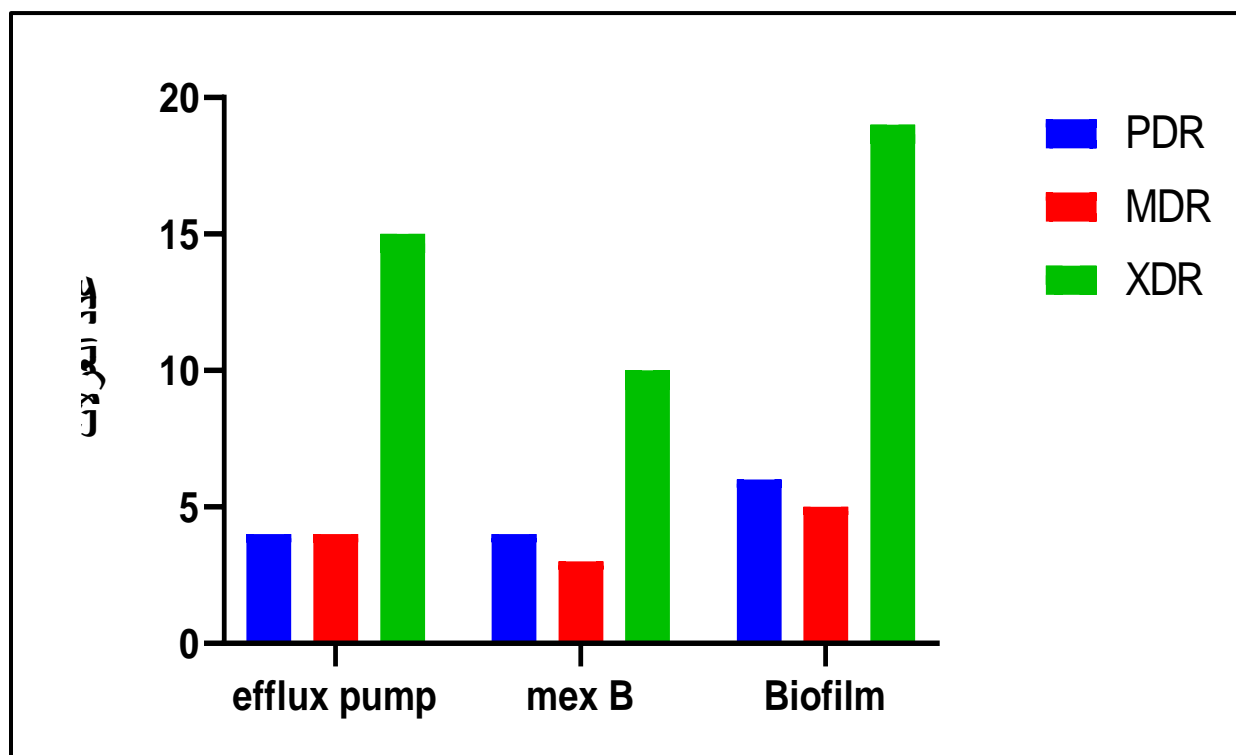
تم الكشف عن جين *mexB* في ١٧ (٥٦,٦٧%) عزلة من بين عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* التي تحتوي على هذا الجين كان فيها ٧ (٤١,١٨%) عزلات منتجة للأغشية الحيوية القوية بينما ٨ (٤٧,٠٦%) عزلات متوسطة الإنتاج في حين كانت عزلتان (١١,٧٦%) ضعيفة الإنتاج للأغشية الحيوية، بالإضافة إلى ذلك كانت جميع عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* الثلاث والعشرون التي أظهرت نشاط ضخ تدفق للمضادات الحيوية من الناحية المظهرية تمتلك كلا جيني المقاومة المرتبطة بالأغشية الحيوية (*tssC1* و *ndvB*).

وقد كشفت هذه الدراسة أيضًا أن *mexB* يحفز مقاومة مجاميع مختلفة من المضادات الحيوية ، متضمنًا ١٠ عزلات تنتمي إلى المقاومة الشديدة للمضادات (XDR) و ٤ عزلات مقاومة شاملة للمضادات (PDR) و ٣ عزلات مقاومة متعددة للأدوية (MDR) ، وكما هو موضح في الشكل 4-12. علاوة على ذلك، فقد أظهرت الدراسة وجود تردد عالٍ لجين *mexB* في بكتيريا *P. aeruginosa* وهذا يشير إلى أن هذا الجين يمكن أن يلعب دورًا في ضراوة هذا العامل الممرض ، وعلى الرغم من عدم تقييم الدور المباشر لمضخة التدفق في تكوين الأغشية الحيوية في هذه الدراسة، فقد لوحظ أن نسبة كبيرة من البكتيريا المكونة للأغشية الحيوية القوية والمتوسطة والضعيفة كانت تحمل هذا الجين.

أشارت دراسة في نيجيريا إلى أن جينات مضخة التدفق تساهم في تكوين الأغشية الحيوية وتلعب دورًا أساسيًا في معدل مقاومة المضادات الحيوية ، وهذا يشير إلى أن مضخات التدفق قد تلعب دورًا مزدوجًا في هذا الكائن المجهرى الممرض (Ugwuanyi et al., 2021).

تشير العديد من الدراسات إلى أن مضخات التدفق تلعب أربعة أدوار مختلفة على الأقل في تكوين الأغشية الحيوية هي تدفق جزيئات المواد البوليميرية خارج خلوية (Extracellular polymeric substances) لتسهيل تكوين مصفوفة الأغشية الحيوية ، التنظيم غير المباشر للجينات المشاركة في تكوين الأغشية الحيوية ، تدفق الجزيئات الضارة، مثل المضادات الحيوية والمواد الأيضية و التأثير على التجميع من خلال تعزيز أو منع الالتصاق بالأسطح والخلايا الأخرى (Alav et al., 2018).

نظرًا لأن الأغشية الحيوية تتميز بوجود ببيئات دقيقة متميزة، فإن الخلايا البكتيرية بداخلها يمكن أن تتواجد في حالات ايضية مختلفة وتميل الطبقات الخارجية للأغشية الحيوية إلى أن تتكون من خلايا هي الأكثر نشاطًا في عملية الايض الغذائي. هذه الملاحظة ذات صلة أيضًا فيما يتعلق بنشاط مضخة التدفق. على سبيل المثال، تبين أن تعبير نظام الضخ MexAB-OprM يعتمد على الحالة الأيضية لبكتيريا *P. aeruginosa*، إذ يكون التعبير في أعلى مستوياته في الخلايا النشطة أيضًا ، ولذلك فإن الخلايا الموجودة في الطبقات الخارجية للأغشية الحيوية هي أكثر عرضة للإفراط في التعبير الجيني عن نظام MexAB-OprM مقارنة بالخلايا الموجودة في الطبقات الداخلية، على الرغم من أنه ليس من الواضح ما إذا كان الإفراط في التعبير عن مضخات التدفق في الأغشية الحيوية يخدم أي غرض آخر غير مقاومة المضادات الحيوية، فمن الواضح أن التعبير عن مضخات التدفق يمكن أن يختلف بشكل كبير داخل طبقات مختلفة من الأغشية الحيوية (Tuon et al., 2022) .



الشكل ٤-١٢: التمثيل البياني للعلاقة بين الاغشية الحيوية وأنظمة التدفق ومقاومة المضادات الحيوية

٤-١١: النمذجة الجزيئية لإنزيم لأدينيلات كاينيز في العزلة القياسية لبكتيريا الزائفة الزنجارية

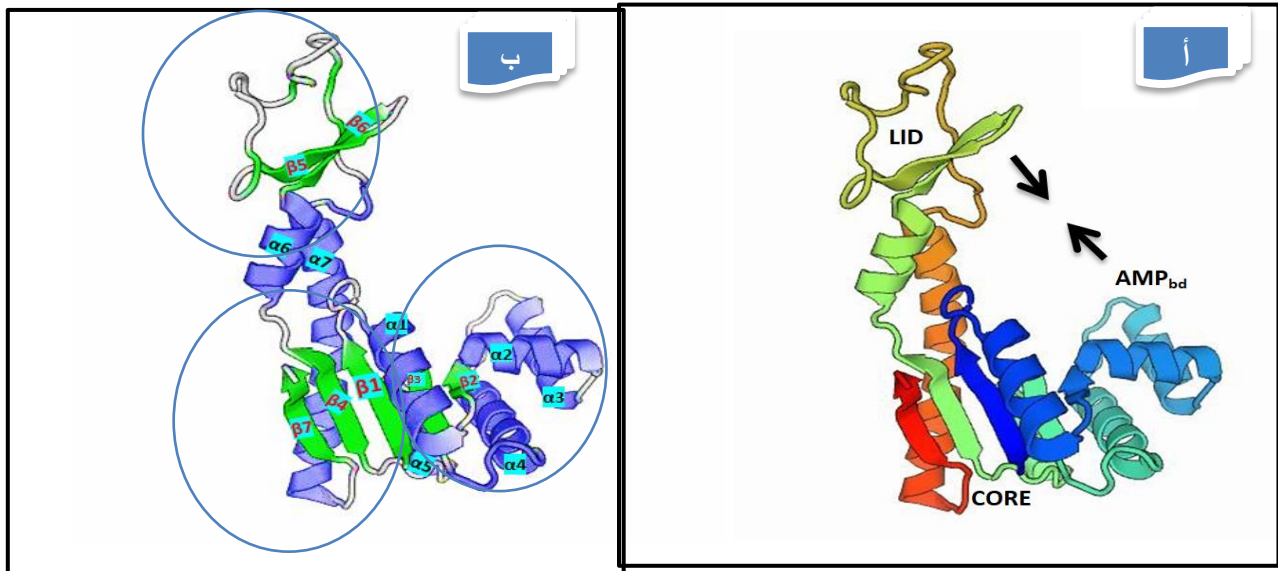
### (Molecular modeling of adenylate kinase in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (ATCC3686))

غالبًا ما تتعطل عملية تحديد تركيب البروتين تجريبيًا بسبب مشاكل الاستنساخ أو التعبير أو التنقية التي قد تمنع الحصول على كمية كافية من البروتين النقي، عندما تقشل التقنيات التجريبية، يمكن أن تكون النمذجة الجزيئية تقنية حسابية مفيدة للتنبؤ بالتركيب ثلاثي الأبعاد للبروتينات غير المعروفة. تستخدم نمذجة التماثل هياكل البروتين المشخصة تجريبيًا من علم البلورات بالأشعة السينية أو (NMR) للتنبؤ بتكوين البروتينات الأخرى على أساس تشابه التسلسل الذي يعكس على الأرجح التشابه التركيبي، يمكن أن توفر النمذجة "تركيب منخفض الدقة" مقارنة بالطريقة التجريبية مع معلومات كافية حول الترتيب الفراغي لثمالات الأحماض الامينية الحرجة في البروتين والتي قد تؤدي إلى توليد فرضيات، مما يسمح بتصميم تجارب جديدة مثل الطفرات التي تستهدف الموقع site directed mutagenesis، لاختبار هذه الفرضيات (Kelley et al., 2015). يلعب أنزيم الأدينيلات كاينيز (Adk) يلعب دورًا حيويًا في الايض الخلوي وتخليق الحامض النووي في جميع الكائنات

الحية. بسبب الاختلافات في الخصائص الحفزية بين Adk الموجودة في بدائيات النوى وفي السائتوبلازم في حقيقيات النوى، هناك اهتمام باستهداف هذا الإنزيم كهدف دوائي ضد العوامل البكتيرية الممرضة (Buchko et al., 2010).

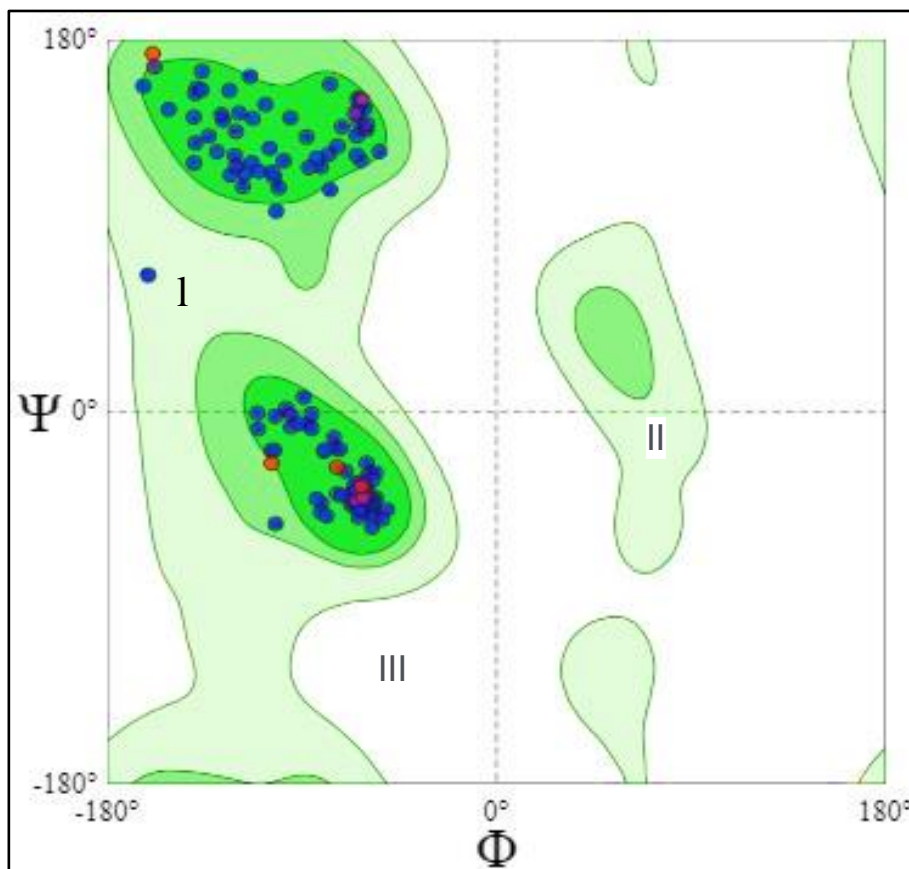
تم إرسال تسلسل الأحماض الأمينية لإنزيم Adk إلى برنامج Swiss model للتنبؤ بتركيب الإنزيم ثلاثي الأبعاد (<https://swissmodel.expasy.org/>). قام برنامج Swiss model بنمذجة ٢٢٠ ثمانية حامض أميني من الإنزيم المماثل الموجود في بكتيريا *Burkholderia pseudomallei* (BpAdk)، تم تحليل وثيقة نموذج تركيب إنزيم Adk بنسبة تغطية (coverage) 98% مع مستوى وثيقة تصل إلى ١٠٠%، (الشكل 4-13).

تشير نتائج النمذجة إلى أن التركيب المتوقع لإنزيم Adk في بكتيريا *P.aeruginosa* مرتب في ثلاثة مناطق فرعية وظيفية (functional subdomains) هي منطقة اللب (core subdomain)، منطقة ارتباط الأدينوسين أحادي الفوسفات (AMP-binding subdomain (AMP<sub>bd</sub>)) ومنطقة ارتباط الأدينوسين ثلاثي الفوسفات (ATP-binding subdomain (LID)). يتكون لب البروتين من سبع صفائح بيتا مركزية متوازية محاطة بسبع من الحلزونات الفا ( $\alpha$ -helix) على محيط منطقة اللب (CORE).



الشكل 4-١٣: (أ) التركيب ثلاثي الأبعاد لنموذج إنزيم الأدينيلات كينيز (Adk) (حلزونات الفا ملونة باللون الأرجواني وصفائح بيتا خضراء اللون). (ب) تنظيم نموذج إنزيم Adk، المناطق الفرعية والوظيفية الثلاثة (domains) احطيت بدوائر والأسمه تشير الى تارجح منطقة LID و AMP<sub>bd</sub> باتجاه بعضهما البعض عند الارتباط بالمادة الأساس.

تمّ تقييم جودة النموذج بواسطة برنامج MolProbity version 4.4 ، باستخدام مخطط راماخاندران (قيمة زوايا الدوران للاواصر الببتيدية بين الأحماض الأمينية المتتالية في سلسلة البروتين). أظهرت النتائج أن جميع ثمالات الأحماض الأمينية للنموذج تقع في المناطق الأكثر تفضيلاً أو المسموح بها (١٠٠%)، مما يشير إلى أن النموذج يمتلك درجة ثقة عالية (الشكل 4-14).



الشكل 4-14: مخطط راماخاندران لنموذج إنزيم الأدينيلات كاينيز في الزائفة الزنجارية (PAAdk)، التي تمّ الحصول عليها من برنامج Swiss model ، تقع جميع الأحماض الأمينية في المناطق المفضلة أو المسموح بها (المنطقة الأولى والثانية I و II) ، بينما تملأ المنطقة الثالثة III (غير المفضلة أو غير المسموح بها) من الأحماض الأمينية .

الفصل الخامس  
الاستنتاجات والتوصيات  
**Conclusions  
&  
Recommendations**

## ١-٥ : الاستنتاجات (Conclusions)

١. أظهرت النتائج انتشار واسع للعدوى الميكروبية في حالات إصابات الأذن قيد الدراسة في محافظة كربلاء المقدسة.
٢. كشفت الدراسة أنّ المسبب الأكثر شيوعاً لإصابات الأذن هي العزلات البكتيرية السالبة لصبغة كرام وبالأخص بكتيريا الزائفة الزنجارية *P. aeruginosa*.
٣. أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن أغلب عزلات *P. aeruginosa* مقاومة للمضادات الحيوية شائعة الاستخدام فيما عدا مضاد الكولستين الذي أظهر فعالية تجاه هذا النوع البكتيري الممرض مما يشير إلى أهمية أتباع التعليمات الصحية وتجنب الاستخدام العشوائي للمضادات الحيوية.
٤. تميزت أغلب عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* المعزولة من إصابات الأذن بالقدرة على إنتاج العديد من عوامل الضراوة بما في ذلك الهيمولايسن ، البروتيز ، البايوسيانين ، مضخات التدفق والأغشية الحيوية.
٥. إنّ تكوين الأغشية في هذه العزلات هو السبب الرئيسي لمقاومة المضادات الحيوية في البكتيريا ويتم دعم هذه القدرة بوساطة وجود جينات المقاومة المرتبطة بالأغشية الحيوية (*tssC1* و *ndvB*) وهذا يشكل تحدياً كبيراً لعلاج الإصابات الناجمة عن هذه البكتيريا.
٦. إنّ وجود مضخات التدفق في بكتيريا *P. aeruginosa* قيد الدراسة يساهم في تكوين الأغشية الحيوية كما تلعب دوراً أساسياً في زيادة المقاومة تجاه العديد من المضادات الحيوية المستخدمة في علاج هذه البكتيريا.
٧. يمثل انزيم الادينيلاز كاينيز احد الاهداف الدوائية الرئيسية التي يمكن من خلالها التحري عن علاجات مستقبلية لبكتيريا *P. aeruginosa* المكونة للغشاء الحيوي وذات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية



## ٢-٥ : التوصيات (Recommendations)

١. مراقبة انتشار إصابات الأذن ذات الإفرازات القححية باتباع كافة الإجراءات الطبية أو الصحية اللازمة.
٢. إجراء مسوحات دورية للكشف عن مقاومة المضادات الحيوية في العزلات البكتيرية وخاصة في بكتيريا *P. aeruginosa* المسببة لإصابات الأذن لتحديد الاتجاهات الناشئة في المقاومة وتطوير استراتيجيات للمواجهة.
٣. إجراء العديد من الدراسات لتحليل التسلسلات المتتابعة ( Sequencing ) لجينات المقاومة المرتبطة بالغشاء الحيوي أو الجينات المسؤولة عن تنظيم مضخات التدفق وغيرها، وذلك بهدف تحديد الطفرات الوراثية في هذه الجينات وفهم تأثيرها على ترجمة البروتين، التي قد تؤدي إلى تطوير المقاومة تجاه المضادات الحيوية .
٤. تطوير فعالية المضادات الحيوية التي لا تزال قيد الاستخدام من خلال تطبيقات علم النانوتكنولوجي، أو التحري عن تأثير العوامل المثبطة لعوامل الضراوة عند استخدامها مع المضادات الحيوية.

المصادر

References

## المصادر العربية:

ملوحي، ناصر محي الدين. (٢٠٢٣). تشريح الأذن وفيزيولوجيا السمع (الطبعة السادسة). دار الغسق للنشر.

## المصادر الأجنبية:

**Abdelazeem**, M., Gamea, A., Mubarak, H., & Elzawawy, N. (2015). Epidemiology, causative agents, and risk factors affecting humanotomycosis infections. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 45(4), 820–826.

**Abdelaziz**, A. A., Kamer, A. M. A., Monofy, K. B. Al, & Madboly, L. A. Al. (2023). Pigment Pyocyanin : Its Production and Biological Activities. In *Microbial Cell Factories* (Vol. 22, Issue 1, pp. 1–14).

**Abdel-Sater**, K. A. (2018). Physiology of the Aquaporins. *American Journal of Biomedical Sciences*, 10(3).

**Abdul-Hussein**, Z. R., & Atia, S. S. (2016). Antimicrobial effect of pyocyanin extracted from *Pseudomonas aeruginosa*. *European Journal of Experimental Biology*, 6(3), 1–4.

**Abebe**, Abrham S. Genet A. Hiwot G. Paulo s; and Melese A. (2014). Isolation, optimization and characterization of protease producing bacteria from soil and water in Gondar town, North West Ethiopia. *International Journal of Bacteriology, Virology and Immunology*.1(3): 020-024

**Abellan-Schneyder**, I., Matchado, M. S., Reitmeier, S., Sommer, A., Sewald, Z., Baumbach, J., List, M., & Neuhaus, K. (2021). Primer, pipelines, parameters: issues in 16S rRNA gene sequencing. *Msphere*, 6(1), 10–1128.

**Adegbiji**, W. A., Alabi, B. S., Olajuyin, O. A., & Nwawolo, C. C. (2014). Earwax impaction: Symptoms, predisposing factors and perception among Nigerians. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, 3(4), 379–382.

**Agarwal**, P., & Devi, L. S. (2017). Otomycosis in a rural community attending a tertiary care hospital: assessment of risk factors and identification of fungal and bacterial agents. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 11(6), DC14.

- Akinduti**, A. P., Osiyemi, J. A., Banjo, T. T., Ejilude, O., El-Ashker, M., Adeyemi, A. G & Isibor, P. O. (2021). Clonal diversity and spatial dissemination of multi-antibiotics resistant *Staphylococcus aureus* pathotypes in Southwest Nigeria. *Plos one*, 16(2), e0247013.
- Al Hamdan**, A. S., Alghamdi, A. A., Alyousif, G. F., Hamza, F. A., Shafey, M. M., AlAmri, A. M., & Sunki, A. A. (2022). Evaluating the prevalence and the risk factors of gram-negative multi-drug resistant bacteria in Eastern Saudi Arabia. *Infection and Drug Resistance*, 475–490.
- Al Marjani**, M. F., Mohammed, N., Suhad, Y., & Mansour, R. H. (2015). Efflux Pump In Colistin Resistant *Pseudomonas Aeruginosa* Isolates *In Baghdad*. *International Journal of Advanced Researc*, 3(11), 680–685.
- Al Rashed**, N., Joji, R. M., Saeed, N. K., & Bindayna, K. M. (2020). Detection of overexpression of efflux pump expression in fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, 10(1), 37–42.
- Alav**, I., Sutton, J. M., & Rahman, K. M. (2018). Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(8), 2003–2020.
- Ali**, F. A., Bakir, S. H., Haji, S. H., & Hussen, B. M. (2021). Evaluation of blaGES-5 and bla veb-1 genes with multidrug-resistant extend, pandrug resistance patterns (MDR, XDR, PDR), and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Cellular and Molecular Biology*, 67(3), 52–60.
- Ali**, K. M., & Al-Jaff, B. M. A. (2021). Source and antibiotic susceptibility of gram-negative bacteria causing superficial incisional surgical site infections. *International Journal of Surgery Open*, 30, 100318.
- Alkaabi**, S. A. G. (2013). Bacterial Isolates and Their Antibiograms of Burn Wound Infections in Burns Specialist Hospital in Baghdad. *Baghdad Science Journal*, 10(2), 331–340.
- Al-Khafaji**, M., Flayyih, M., & Arsheed, M. (2013). Isolation, Identification and Detection of Some Virulence Factors of *Staphylococci* in milk and cheese in Baghdad .. *In Iraqi Journal of Science* (Vol. 54, Issue January, pp. 1057–1067)

**Al-Mohammed**, T. A., & Mahmood, H. M. (2024). Carbapenem Resistance Related with Biofilm Formation and Pilin Genes in Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. *Iraqi Journal of Pharmaceutical Sciences* (P-ISSN 1683-3597 E-ISSN 2521-3512), 33(1), 72–78.

**Al-Nasrawy**, M. L., Abdali, S. A., & Jawad, M. S. (2022). Molecular Research Comparing the Probabilities of Burkholderia Cepacia Bacterium Diagnosis Procedures. *In Archives of Razi Institute* (Vol. 77, Issue 2, pp. 717–725).

**Al-Shammary**, A. H. A. (2015). Correlation of Biofilms-Pyocyanin producing *Pseudomonas aeruginosa* with the antibiotics resistant profiles A. *International Journal for Sciences and Technology*, 143(2013), 1–14.

**Altaai**, M. E., Aziz, I. H., & Marhoon, A. A. (2014). Identification *Pseudomonas aeruginosa* by 16s rRNA gene for Differentiation from Other *Pseudomonas* Species that isolated from Patients and environment. *Baghdad Science Journal*, 11(2), 1028–1034.

**Alturkistani**, H. A., Tashkandi, F. M., & Mohammedsaleh, Z. M. (2016). Histological stains: a literature review and case study. *Global Journal of Health Science*, 8(3), 72.

**Alwan**, M. K., Ghaima, K. K., & Khalaf, Z. S. (2021). Effect of Combined Antibiotics and Biofilm Formation in Some Bacterial Pathogens from Otitis Media among Children in Baghdad, Iraq. *Medico-Legal Update*, 21(1).

**Anbazhagan**, Thavitiki PR, Varra M, Annamalai L, Putturu R, Lakkineni VR, Pesingi PK.(2019) Evaluation of efflux pump activity of multidrug resistant *Salmonella Typhimurium* isolated from poultry wet markets in India. *Infection Drug Resistance*;12:1081–8.

**Ansari**, A., Tariq, M. A., & Sadiq, N. M. (2023). Histology, Ear. *In StatPearls. StatPearls Publishing*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545170/>.

**Anthwal**, N., & Thompson, H. (2016). The development of the mammalian outer and middle ear. *Journal of Anatomy*, 228(2), 217–232.

- Anwar**, K., & Gohar, M. S. (2014). Otomycosis; clinical features, predisposing factors and treatment implications. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 30(3), 564.
- Araten**, A. H., Brooks, R. S., Choi, S. D. W., Esguerra, L. L., Savchyn, D., Wu, E. J., Leon, G., Sniezek, K. J., & Brynildsen, M. P. (2024). Cephalosporin resistance, tolerance, and approaches to improve their activities. *The Journal of Antibiotics*, 77(3), 135–146.
- Asri**, P. M., Naftali, Z., & Marliyawati, D. (2018). Hubungan antara penggunaan cotton bud dengan serumen obsturan. *Journal Kedokteran Diponegoro*, 7(2), 892–905.
- Auda**, I. G., Salman, I. M. A., & Odah, J. G. (2020). Efflux pumps of Gram-negative bacteria in brief. *Gene Reports*, 20, 100666.
- Aurilio**, C., Sansone, P., Barbarisi, M., Pota, V., Giaccari, L. G., Coppolino, F., Barbarisi, A., Passavanti, M. B., & Pace, M. C. (2022). Mechanisms of Action of Carbapenem Resistance. *Antibiotics*, 11(3), 1–8.
- Azuama**, O. C., Ortiz, S., Quirós-Guerrero, L., Bouffartigues, E., Tortuel, D., Maillot, O., Feuilloley, M., Cornelis, P., Lesouhaitier, O., & Grougnet, R. (2020). Tackling *Pseudomonas aeruginosa* virulence by mulinane-like diterpenoids from *Azorella atacamensis*. *Biomolecules*, 10(12), 1626.
- Balcázar**, J. L., Subirats, J., & Borrego, C. M. (2015). The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 6, Issue OCT).
- Banar**, M., Emaneini, M., Satarzadeh, M., Abdellahi, N., Beigverdi, R., Van Leeuwen, W. B., & Jabalameli, F. (2016). Evaluation of mannosidase and trypsin enzymes effects on biofilm production of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wound infections. *PLoS ONE*, 11(10), 1–13.
- Barritt**, L. C. (2014). Otitis Related Disorders. In *Reference Module in Biomedical Research*. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.05198-9>.
- Beaudoin**, T., Zhang, L., Hinz, A. J., Parr, C. J., & Mah, T.-F. (2012). The biofilm-specific antibiotic resistance gene *ndvB* is important for expression of

ethanol oxidation genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of Bacteriology*, 194(12), 3128–3136.

**Belas, R.** (2014). Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. *Trends in Microbiology*, 22(9), 517–527.

**Bergeau, D., Mazurier, S., Barbey, C., Merieau, A., Chane, A., Goux, D., Bernard, S., Driouich, A., Lemanceau, P., & Vicré, M.** (2019). Unusual extracellular appendages deployed by the model strain *Pseudomonas fluorescens* C7R12. *PLoS One*, 14(8), e0221025.

**Berrazeg, M., Jeannot, K., Ntsogo Enguéné, V. Y., Broutin, I., Loeffert, S., Fournier, D., & Plésiat, P.** (2015). Mutations in  $\beta$ -lactamase AmpC increase resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates to antipseudomonal cephalosporins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(10), 6248–6255.

**Bhardwaj, S., Bhatia, S., Singh, S., & Franco Jr, F.** (2021). Growing emergence of drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and attenuation of its virulence using quorum sensing inhibitors: A critical review. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 24(6), 699.

**Billings, N., Ramirez Millan, M., Caldara, M., Rusconi, R., Tarasova, Y., Stocker, R., & Ribbeck, K.** (2013). The extracellular matrix component Psl provides fast-acting antibiotic defense in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathogens*, 9(8), e1003526.

**Bisht, K., Luecke, A. R., & Wakeman, C. A.** (2023). Temperature-specific adaptations and genetic requirements in a biofilm formed by *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1032520.

**Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V.** (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42–51.

**Bojanović, M., Ignjatović, A., Stalević, M., Arsić-Arsenijević, V., Randelović, M., Gerginić, V., Stojanović-Radić, Z., Stojković, O., Živković-Marinkov, E., & Otašević, S.** (2022). Clinical presentations, cluster analysis and laboratory-based

investigation of *Aspergillus otomycosis* a single center experience. *Journal of Fungi*, 8(3), 315.

**Bolognese**, F., Bistoletti, M., Barbieri, P., & Orlandi, V. T. (2016). Honey-sensitive *Pseudomonas aeruginosa* mutants are impaired in catalase A. *Microbiology*, 162(9), 1554–1562.

**Botelho**, J., Grosso, F., & Peixe, L. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*—Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resistance Updates*, 44, 100640.

**Bouteiller**, M., Dupont, C., Bourigault, Y., Latour, X., Barbey, C., Koutoghghi, Y., & Merieau, A. (2021). *Pseudomonas* flagella: generalities and specificities. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3337.

**Brindhadevi**, K., LewisOscar, F., Mylonakis, E., Shanmugam, S., Verma, T. N., & Pugazhendhi, A. (2020). Biofilm and Quorum sensing mediated pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Process Biochemistry*, 96, 49–57.

**Brink**, B. (2016). Urease Test Protocol. In *American Society for Microbiology* (Issue November 2010, pp. 1–7).

**Brinkman**, F. S. L., Winsor, G. L., Done, R. E., Filloux, A., Francis, V. I., Goldberg, J. B., Greenberg, E. P., Han, K., Hancock, R. E. W., & Haney, C. H. (2021). The *Pseudomonas aeruginosa* whole genome sequence: a 20th anniversary celebration. In *Advances in microbial physiology* (Vol. 79, pp. 25–88). Elsevier.

**Buchko**, G. W., Robinson, H., Abendroth, J., Staker, B. L., & Myler, P. J. (2010). Structural characterization of *Burkholderia pseudomallei* adenylate kinase (Adk): profound asymmetry in the crystal structure of the ‘open’ state. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394(4), 1012–1017.

**Cai**, W., Liao, H., Lu, M., Zhou, X., Cheng, X., Staehelin, C., & Dai, W. (2023). New Evolutionary Insights into RpoA: A Novel Quorum Sensing Reprogramming Factor in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Biology and Evolution*, 40(10), msad203.



**Campisano, A., Schroeder, C., Schemionek, M., Overhage, J., & Rehm, B. H. A.** (2006). PsID is a secreted protein required for biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 3066–3068.

**Cao, F., Guibaud, G., Bourven, I., Pechaud, Y., Lens, P., & van Hullebusch, E. D.** (2019). Role of extracellular polymeric substances (EPS) in cell surface hydrophobicity. *Microbial Biofilms in Bioremediation and Wastewater Treatment*, 128-153.

**Celedón, R. S., & Díaz, L. B.** (2021). Natural pigments of bacterial origin and their possible biomedical applications. *Microorganisms*, 9(4), 739.

**Chandran, M., Ahmed, M. F., & Parthasarathi, N.** (2014). A comparative study on the protease producing bacteria isolated from dairy effluents of Chennai region, identification, characterization, and application of enzyme in detergent formulation. *Asian Journal of Microbiology Biotechnology and Environmental Sciences*, 16, 41-46.

**Chauhan, A., Jindal, T., Chauhan, A., & Jindal, T.** (2020). Biochemical and molecular methods for bacterial identification. *Microbiological Methods for Environment, Food and Pharmaceutical Analysis*, 425–468.

**Chen, L., Zou, Y., Kronfl, A. A., & Wu, Y.** (2020). Type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* is associated with biofilm formation but not environmental adaptation. *Microbiologyopen*, 9(3), e991.

**Chetri, S.** (2023). The culmination of multidrug-resistant efflux pumps vs. meager antibiotic arsenal era: Urgent need for an improved new generation of EPIs. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1149418.

**Chevalier, S., Bouffartigues, E., Bodilis, J., Maillot, O., Lesouhaitier, O., Feuilloley, M. G. J., Orange, N., Dufour, A., & Cornelis, P.** (2017). Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *The Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*, 41(5), 698–722.

**Choi, U., & Lee, C.-R.** (2019). Antimicrobial agents that inhibit the outer membrane assembly machines of gram-negative bacteria. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(1), 1-10.

- Chonmaitree, T., Trujillo, R., Jennings, K., Alvarez-Fernandez, P., Patel, J. A., Loeffelholz, M. J., Nokso-Koivisto, J., Matalon, R., Pyles, R. B., & Miller, A. L.** (2016). Acute otitis media and other complications of viral respiratory infection. *Pediatrics*, 137(4).
- Ciofu, O., & Tolker-Nielsen, T.** (2019). Tolerance and resistance of pseudomonas aeruginosabiofilms to antimicrobial agents-how P.aeruginosa can escape antibiotics.*Frontiersin Microbiology*,10.
- Coleman, A., & Cervin, A.** (2019). Probiotics in the treatment of otitis media. The past, the present and the future. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 116, 135–140.
- Coulthurst, S.** (2019). The Type VI secretion system: a versatile bacterial weapon. *Microbiology*, 165(5), 503–515.
- Crone, S., Vives- Flórez, M., Kvich, L., Saunders, A. M., Malone, M., Nicolaisen, M. H., Martínez- García, E., Rojas- Acosta, C., Catalina Gomez- Puerto, M., & Calum, H.** (2020). The environmental occurrence of Pseudomonas aeruginosa. *Journal of Pathology, Microbiology and Immunology*, 128(3), 220–231.
- Da Costa Lima, J. L., Alves, L. R., Da Paz, J. N. P., Rabelo, M. A., Maciel, M. A. V., & De Moraes, M. M. C.** (2017). Analysis of biofilm production by clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa from patients with ventilator-Associated pneumonia. In *Revista Brasileira de Terapia Intensiva* (Vol. 29, Issue 3, pp. 310–316).
- Dagostino, I., & Carradori, S.** (2024). Urease. In *Metalloenzymes. Academic Press* (pp. 393-410).
- Dagur, P., Ghosh, M., & Patra, A.** (2023). Aminoglycoside antibiotics. In *Medicinal Chemistry of Chemotherapeutic Agents. Elsevier* (pp. 135–155).
- Daniel, M., Imtiaz-Umer, S., Fergie, N., Birchall, J. P., & Bayston, R.** (2012). Bacterial involvement in otitis media with effusion. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 76(10), 1416–1422.
- Danishyar, A., & Ashurst, J. V.** (2017). Acute otitis media. StatPearls Publishing; *PubMed Central*: 29262176. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29262176>.

- Davenport, C. F.** (2011). *Pseudomonas aeruginosa* genomic structure and diversity. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, Vol 2 (2011).
- Davis, T. J., Karanjia, A. V, Bhebhe, C. N., West, S. B., Richardson, M., & Bean, H. D.** (2020). *Pseudomonas aeruginosa* volatilome characteristics and adaptations in chronic cystic fibrosis lung infections. *American Society for Microbiology*, 5(5), 10–1128.
- De Sousa, T., Hébraud, M., Dapkevicius, M. L. N. E., Maltez, L., Pereira, J. E., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Igrejas, G., & Poeta, P.** (2021). Genomic and Metabolic Characteristics of the Pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12892.
- Dela Cruz, T. E. E., & Torres, J. M. O.** (2012). Gelatin hydrolysis test protocol. *American Society for Microbiology*. 20161-10.
- Del Mar Cendra, M., & Torrents, E.** (2021). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and their partners in crime. *Biotechnology Advances*, 49, 107734.
- Diepold, A., & Armitage, J. P.** (2015). Type III secretion systems: the bacterial flagellum and the injectisome. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1679), 20150020.
- Diggle, S. P., & Whiteley, M.** (2020). Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology*, 166(1), 30–33.
- Divyakolu, S., Chikkala, R., Ratnakar, K. S., & Sritharan, V.** (2019). Hemolysins of *Staphylococcus aureus* an update on their biology, role in pathogenesis and as targets for anti-virulence therapy. *Advances in Infectious Diseases*, 9(2), 80–104.
- Du, D., Wang-Kan, X., Neuberger, A., Van Veen, H. W., Pos, K. M., Piddock, L. J. V, & Luisi, B. F.** (2018). Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nature Reviews Microbiology*, 16(9), 523–539.
- Ekdale, E. G.** (2016). Form and function of the mammalian inner ear. *Journal of Anatomy*, 228(2), 324–337.
- El Edel, R. H., El-Hendy, A. A. E.-K., Salama, M. F., & ElKholy, R. M.** (2023). Type III secretion system effector proteins genes, drug resistance profiles and

biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical specimens. *Microbes and Infectious Diseases*.2023, 4(2), 563-574.

**El Naghy**, W. S., Hamam, S. A., Wasfy, T. A., & Samy, S. M. (2020). Detection of Biofilm Formation by Different Bacterial Isolates of Contact Lens. *Egyptian Journal of Medical Microbiology*, 29(4), 93–100.

**Elmanama**, A. A., Tayyem, N. E. A., & Allah, S. A. N. (2014). The bacterial etiology of otitis media and their antibiogram among children in Gaza Strip, Palestine. *Egyptian Journal of Ear, Nose, Throat and Allied Sciences*, 15(2), 87–91.

**El-sadda**, S. S., Esawy, A., ELTarabili, R. M., & Khafagy, A. (2021). Molecular characterization and genetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* recovered from broiler chickens. *Suez Canal Veterinary Medical Journal*, 26(1), 61-77.

**El-Said**, E. E., Ali, S. R., & Zakaria, D. M. (2012). Efflux Pump Contribution to Multidrug Resistance in *Pseudomonas Aeruginosa* and the Effect of Using an Efflux Pump Inhibitor on Ciprofloxacin Resistance. *Egyptian Journal of Medical Microbiology*, 21(2), 91–104.

**Feigin**, R. D., Cherry, J., Demmler-Harrison, G. J., & Kaplan, S. L. (2009). Textbook of pediatric infectious diseases. *Elsevier Health Sciences* (Vol. 1).

**Feng**, W., Sun, F., Wang, Q., Xiong, W., Qiu, X., Dai, X., & Xia, P. (2017). Epidemiology and resistance characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the respiratory department of a hospital in China. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 8, 142–147.

**Fernando**, D. M., & Kumar, A. (2013). Resistance-nodulation-division multidrug efflux pumps in gram-negative bacteria: role in virulence. *Antibiotics*, 2(1), 163–181.

**Finlayson**, E. A., & Brown, P. D. (2011). Comparison of antibiotic resistance and virulence factors in pigmented and non-pigmented *Pseudomonas aeruginosa*. *West Indian Medical Journal*, 24–32.

**Fisher**, J. F., Qian, Y., & Mobashery, S. (2023).  $\beta$ -Lactam antibiotics. In Medicinal Chemistry of Chemotherapeutic Agents. *Elsevier* (pp. 67–113).

- Fisher**, R. A., Gollan, B., & Helaine, S. (2017). Persistent bacterial infections and persister cells. *Nature Reviews Microbiology*, 15(8), 453–464.
- Forbes**, B. A., Sahm, D. F., & Weissfeld, A. S. (2013). *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*. 13th. St. Louis, MI. USA: Mosby Inc.
- Fowler**, K. B., & Boppana, S. B. (2018). Congenital cytomegalovirus infection. *Seminars in Perinatology*, 42(3), 149–154.
- Friedman**, N. D., Kaye, K. S., Stout, J. E., McGarry, S. A., Trivette, S. L., Briggs, J. P., Lamm, W., Clark, C., MacFarquhar, J., & Walton, A. L. (2002). Health care–associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections. *Annals of Internal Medicine*, 137(10), 791–797.
- Froböse**, N. J., Bjedov, S., Schuler, F., Kahl, B. C., Kampmeier, S., & Schaumburg, F. (2020). Gram staining: a comparison of two automated systems and manual staining. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(12), 10–1128.
- Frösler**, J., Panitz, C., Wingender, J., Flemming, H.-C., & Rettberg, P. (2017). Survival of *Deinococcus geothermalis* in biofilms under desiccation and simulated space and martian conditions. *Astrobiology*, 17(5), 431–447.
- Fujisawa**, K. (2023). Regulation of Adenine Nucleotide Metabolism by Adenylate Kinase Isozymes: Physiological Roles and Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6).
- Gajdács**, M., Bátor, Z., Ábrók, M., Lázár, A., & Burián, K. (2020). Characterization of resistance in gram-negative urinary isolates using existing and novel indicators of clinical relevance: a 10-year data analysis. *Life*, 10(2), 16.
- Galdino**, A. C. M., Viganor, L., Ziccardi, M., Nunes, A. P. F., Dos Santos, K. R. N., Branquinha, M. H., & Santos, A. L. S. (2017). Heterogeneous production of proteases from Brazilian clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(10), 630–637.
- Getaneh**, A., Ayalew, G., Belete, D., Jemal, M., & Biset, S. (2021). Bacterial etiologies of ear infection and their antimicrobial susceptibility pattern at the university of Gondar comprehensive specialized hospital, Gondar, Northwest

Ethiopia: a six-year retrospective study. *Infection and Drug Resistance*, 4313–4322.

**Ghosh**, R., Chatterjee, S., & Mandal, N. C. (2020). *Stenotrophomonas*. In *Beneficial Microbes in Agro-Ecology: Bacteria and Fungi* (pp. 427–442).

**Goli**, H. R., Nahaei, M. R., Rezaee, M. A., Hasani, A., Samadi Kafil, H., Aghazadeh, M., & Sheikhalizadeh, V. (2016). Contribution of mexAB-oprM and mexXY (-oprA) efflux operons in antibiotic resistance of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Tabriz, Iran. *In Infection, Genetics and Evolution* (Vol. 45, pp. 75–82).

**Golovkine**, G., Reboud, E., & Huber, P. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* takes a multi-target approach to achieve junction breach. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 532.

**Gompper**, G., & Schick, M. (2007). Soft Matter. *In Soft Matter* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1002/9783527617050>.

**Gonçalves**, T., & Vasconcelos, U. (2021). Colour me blue: the history and the biotechnological potential of pyocyanin. *Molecules*, 26(4), 927.

**Green**, M. R., & Sambrook, J. (2019). Analysis of DNA by agarose gel electrophoresis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(1), pdb-top100388.

**Hagiwara**, S., Tamura, T., Satoh, K., Kamewada, H., Nakano, M., Shinden, S., Yamaguchi, H., & Makimura, K. (2019). The molecular identification and antifungal susceptibilities of *Aspergillus* species causing otomycosis in Tochigi, Japan. *Mycopathologia*, 184, 13–21.

**Hailu**, D., Mekonnen, D., Derby, A., Mulu, W., & Abera, B. (2016). Pathogenic bacteria profile and antimicrobial susceptibility patterns of ear infection at Bahir Dar Regional Health Research Laboratory Center, Ethiopia. *SpringerPlus*, 5(1).

**Hain**, T. C., & Helminski, J. O. (2007). Anatomy and physiology of the normal vestibular system. *Vestibular Rehabilitation*, 1(1), 2.

**Haque**, M., Sartelli, M., McKimm, J., & Bakar, M. A. (2018). Health care-associated infections—an overview. *Infection and Drug Resistance*, 2321–2333.

- Haraoui, L.-P., & Blaser, M. J. (2023).** The Microbiome and Infectious Diseases. *Clinical Infectious Diseases*, 77(Supplement-6), S441–S446.
- Harrigan, W. F., & McCance, M. E. (2014).** Laboratory methods in microbiology. *Academic press*. Cambridge, MA, USA, 2014; p. 374. ISBN 9781483274348.
- Hasan, T. H., & Al-Harmoosh, R. A. (2020).** Mechanisms of antibiotics resistance in bacteria. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11 (6), 817-823.
- Hassan, K. A., Liu, Q., Henderson, P. J. F., & Paulsen, I. T. (2015).** Homologs of the *Acinetobacter baumannii* AceI transporter represent a new family of bacterial multidrug efflux systems. *American Society for Microbiology*, 6(1), 10–1128.
- Hatite Al-Daraghi, W. A., & Abdulkadhim Al-Badrwi, M. S. (2020).** Molecular Detection for Nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* and its Relationship with multidrug Resistance, Isolated from Hospitals Environment. *Medico-Legal Update*, 20(1).
- Hemmati, J., Nazari, M., Ahmadi, A., Bayati, M., Jalili, M., Taheri, M., Mohammadi, Y., & Asghari, B. (2024).** In vitro evaluation of biofilm phenotypic and genotypic characteristics among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Hamadan, West of Iran. *Journal of Applied Genetics*, 65(1), 213–222.
- Heroine, M. M., Jean Baptiste, H. F., Victorine Lorette, Y., Rufin Marie, T. K., Pythagore, F. S., Pierre, E., Fabrice, F. B., & Jules-Roger, K. (2020).** Isolation of endophytic fungi from *Cola acuminata* Schott & Endl, and antifungal activity against *Candida* Sp. *European Journal of Biology and Biotechnology*, 1(5).
- Hoge, R., Pelzer, A., Rosenau, F., & Wilhelm, S. (2010).** Weapons of a pathogen: proteases and their role in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 2, 383–395.
- Horcajada, J. P., Montero, M., Oliver, A., Sorlí, L., Luque, S., Gómez-Zorrilla, S., Benito, N., & Grau, S. (2019).** Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(4), 10–1128.

- Hou, W., Sun, X., Wang, Z., & Zhang, Y. (2012).** Biofilm-forming capacity of *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa* from ocular infections. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53(9), 5624–5631.
- Hussein, H. A., Saleh, B. H., & Zbar, N. S. (2019).** Production of Protease Mutant *Pseudomonas aeruginosa* isolated form clinical samples. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, Volume 10, Issue 10.
- Huszczynski, S. M., Lam, J. S., & Khursigara, C. M. (2019).** The role of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide in bacterial pathogenesis and physiology. *Pathogens*, 9(1), 6.
- Ibrahim, A. H. (2022).** Link Between Some Virulence Factors Genes and Antibacterial Resistance of *Pseudomonas Aeruginosa*. In *Iraqi Journal of Agricultural Sciences* (Vol. 53, Issue 5, pp. 985–993).
- Ismail, S. T., & Altaai, M. I. N. (2021).** Study ndvB gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* producing biofilm. *Pathogens*, 21(1), 961.
- Ito, C. A. S., Bail, L., Arend, L. N. V. S., Nogueira, K. da S., & Tuon, F. F. (2021).** The activity of ceftazidime/avibactam against carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Infectious Diseases*, 53(5), 386–389.
- Jabber, E. Y. (2023).** Isolation and identification of opportunistic fungi that causes for Otitis. In *Migration Letters*, Vol. 20, Issue S2, pp. 178–186.
- Jacobsen, T., Bardiaux, B., Francetic, O., Izadi-Pruneyre, N., & Nilges, M. (2020).** Structure and function of minor pilins of type IV pili. *Medical Microbiology and Immunology*, 209(3), 301–308.
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M., & Kamil, M. A. (2018).** Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(1), 7–11.
- Janice, J., Agyepong, N., Owusu-Ofori, A., Govinden, U., Essack, S. Y., Samuelsen, Sundsfjord, A., & Pedersen, T. (2021).** Carbapenem resistance determinants acquired through novel chromosomal integrations in extensively



drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65(7), 10–1128.

**Jasim, R. A., & Jasim, R. M.** (2020). Isolation and identification of pathogenic bacteria infection and treatment by active substances isolated from *Agaricus bisporus* fungi. *Plant Archives*, 20(1), 2732–2735.

**Javadikasgari, H., Soltesz, E. G., & Gillinov, A. M.** (2018). Surgery for Atrial Fibrillation. In *Atlas of Cardiac Surgical Techniques* (pp. 479–488).

**Jayaprakash, C., & Ummer, N.** (2016). Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical specimens and their susceptibility pattern to Amikacin, Ceftazidime, and Ciprofloxacin. *Indian Journal of Basic and Applied Medical Research*, 5(3), 179–186.

**Jung, S. Y., Kim, D., Park, D. C., Lee, E. H., Choi, Y.-S., Ryu, J., Kim, S. H., & Yeo, S. G.** (2021). Immunoglobulins and transcription factors in otitis media. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 3201.

**Jurado-Martín, I., Sainz-Mejías, M., & McClean, S.** (2021). *Pseudomonas aeruginosa*: an audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 3128.

**Juyal, D., Sharma, M., Negi, V., Prakash, R., & Sharma, N.** (2017). *Pseudomonas aeruginosa* and its sensitivity spectrum in chronic suppurative otitis media: A study from Garhwal hills of Uttarakhand State, India. *Indian Journal of Otology*, 23(3), 180–184.

**Kagan, J. C.** (2017). Lipopolysaccharide detection across the kingdoms of life. *Trends in Immunology*, 38(10), 696–704.

**Kakoullis, L., Papachristodoulou, E., Chra, P., & Panos, G.** (2021). Mechanisms of antibiotic resistance in important gram-positive and gram-negative pathogens and novel antibiotic solutions. *Antibiotics*, 10(4), 415.

**Kalluf, K. O., Arend, L. N., Wuicik, T. E., Pilonetto, M., & Tuon, F. F.** (2017). Molecular epidemiology of SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* by rep-PCR in hospitals in Parana, Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, 49, 130–133.

- Karami, P., Khaledi, A., Mashoof, R. Y., Yaghoobi, M. H., Karami, M., Dastan, D., & Alikhani, M. Y. (2020).** The correlation between biofilm formation capability and antibiotic resistance pattern in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene Reports*, 18, 100561.
- Karami, P., Mohajeri, P., Mashouf, R. Y., Karami, M., Yaghoobi, M. H., Dastan, D., & Alikhani, M. Y. (2019).** Molecular characterization of clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a burn center. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1731–1736.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. (2015).** The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature protocols*, 10(6), 845-858.
- Kello, E., Greenberg, R., Li, W., Polansky, S., Maldonado, R., Peter, Y., & Basu, P. (2023).** The Effect of Antibiotic Treatment and Gene Expression of Mex B Efflux Transporters on the Resistance in *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilms. *Applied Microbiology*, 3(3), 709–721.
- Ketelut-Carneiro, N., & Fitzgerald, K. A. (2020).** Inflammasomes. *Current Biology*, 30(12), R689–R694.
- Khairkar, M., Deshmukh, P., Maity, H., & Deotale, V. (2023).** Chronic suppurative otitis media: a comprehensive review of epidemiology, pathogenesis, microbiology, and complications. *Cureus*, 15(8).
- Khan, M. A., & Faiz, A. (2016).** Antimicrobial resistance patterns of *Pseudomonas aeruginosa* in tertiary care hospitals of Makkah and Jeddah. *In Annals of Saudi Medicine* (Vol. 36, Issue 1, pp. 23–28).
- Khosravi, A. D., Motahar, M., & Abbasi Montazeri, E. (2017).** The frequency of class1 and 2 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in a burn center of Ahvaz, Iran. *PloS One*, 12(8), e0183061.
- Kim, M., & Chun, J. (2014).** 16S rRNA gene-based identification of bacteria and archaea using the EzTaxon server. *In Methods in microbiology* (Vol. 41, pp. 61-74). Academic Press.

- Kohlerschmidt**, D. J., Mingle, L. A., Dumas, N. B., & Nattanmai, G. (2021). Identification of aerobic Gram-negative bacteria. *In Practical handbook of microbiology Routledge Resource Centre Press* (pp. 59-70).
- Kojima**, S., Terashima, H., & Homma, M. (2020). Regulation of the single polar flagellar biogenesis. *Biomolecules*, 10(4), 533.
- Kord**, M., Ardebili, A., Jamalana, M., Jahanbakhsh, R., Behnampour, N., & Ghaemi, E. A. (2018). Evaluation of biofilm formation and presence of ica genes in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. *Osong public health and research perspectives*, 9(4), 160.
- Kornelsen**, V., & Kumar, A. (2021). Update on multidrug resistance efflux pumps in *Acinetobacter* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65(7), 10–1128.
- Koziel**, J., & Potempa, J. (2013). Protease-armed bacteria in the skin. *Cell and Tissue*
- Krause**, W. J. (2009). Ear. *Histology Blog.Research*, 351(2), 325–337.
- Kumar**, R., & Singh, G. (2019). Study of Bacterial Pathogens and Antibiotic Sensitivity Pattern of Ear Infections in Patients with Chronic Suppurative Otitis Media Attending a Tertiary Care Hospital in Panipat. *Journal of Medical Sciences and Health*, 5(2), 19–23.
- Kumbhare**, P. H. (2023). Resistant *Staphylococcus aureus* in clinical specimen isolates from Ballarpur area hospitals. *International Journal of Researches in Biosciences, Agriculture & Technology*, 22–26.
- Kurabi**, A., Pak, K., Ryan, A. F., & Wasserman, S. I. (2016). Innate immunity: orchestrating inflammation and resolution of otitis media. *Current Allergy and Asthma Reports*, 16, 1–9.
- Langendonk**, R. F., Neill, D. R., & Fothergill, J. L. (2021). The building blocks of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for current resistance-breaking therapies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 665759.

- Le, T. N., Westerberg, B. D., & Lea, J. (2019).** Vestibular neuritis: recent advances in etiology, diagnostic evaluation, and treatment. *Vestibular Disorders*, 82, 87–92.
- Lee, J., & Zhang, L. (2015).** The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & Cell*, 6(1), 26–41.
- Leichtle, A., Lai, Y., Wollenberg, B., Wasserman, S. I., & Ryan, A. F. (2011).** Innate signaling in otitis media: pathogenesis and recovery. *Current Allergy and Asthma Reports*, 11, 78–84.
- Lemarié, C., Legeay, C., Lasocki, S., Mahieu, R., Kouatchet, A., Bahier, L., Onillon, L., Corre, M., Kempf, M., & Eveillard, M. (2020).** Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase Enterobacteriaceae (ESBLE) in intensive care units: strong correlation with the ESBLE colonization pressure in patients but not same species. *Journal of Hospital Infection*, 104(1), 53–56.
- Li, B., Yin, F., Zhao, X., Guo, Y., Wang, W., Wang, P., Zhu, H., Yin, Y., & Wang, X. (2020).** Colistin resistance gene *mcr-1* mediates cell permeability and resistance to hydrophobic antibiotics. *Frontiers in Microbiology*, 10, 3015.
- Li, H., Liu, L., Li, C., Liu, X., Ziadi, N., & Shi, Y. (2023).** Efficiency of Different Soil Sterilization Approaches and Their Effects on Soil Particle Size Distribution. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 1–12.
- Li, H., Luo, Y.-F., Williams, B. J., Blackwell, T. S., & Xie, C.-M. (2012).** Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies. *International Journal of Medical Microbiology*, 302(2), 63–68.
- Li, X.-Z., Elkins, C. A., & Zgurskaya, H. I. (2016).** Efflux-mediated antimicrobial resistance in bacteria: mechanisms, regulation and clinical implications. *Springer*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-39658-3>.
- Li, X.-Z., Plésiat, P., & Nikaido, H. (2015).** The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(2), 337–418.

**Liu, Y., She, P., Xu, L., Chen, L., Li, Y., Liu, S., Li, Z., Hussain, Z., & Wu, Y.** (2021). Antimicrobial, antibiofilm, and anti-persister activities of penfluridol against *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 727692.

**Liu, Y.-Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L.-X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., & Huang, X.** (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(2), 161–168.

**Llanes, C., Köhler, T., Patry, I., Dehecq, B., van Delden, C., & Plésiat, P.** (2011). Role of the MexEF-OprN efflux system in low-level resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(12), 5676–5684.

**Llanes, C., Pourcel, C., Richardot, C., Plésiat, P., Fichant, G., Cavallo, J.-D., Mérens, A., Group, G. S., Vu-Thien, H., & Leclercq, R.** (2013). Diversity of  $\beta$ -lactam resistance mechanisms in cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: a French multicentre study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(8), 1763–1771.

**Long, M.** (2013). Otitis externa. *Pediatrics in Review*, 34(3), 143–144.

**López-Calleja, A. I., Morales, E. M., Medina, R. N., Esgueva, M. F., Pareja, J. S., Moya, J. M. G.-L., Cerón, I. F., Bayon, J. V., & López, A. R.** (2019). Antimicrobial activity of ceftolozane-tazobactam against multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a Spanish hospital. *Revista Española de Quimioterapia*, 32(1), 68.

**Lorusso, A. B., Carrara, J. A., Barroso, C. D. N., Tuon, F. F., & Faoro, H.** (2022). Role of efflux pumps on antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24), 15779.

**Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., & Olsson-Liljequist, B.** (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281.

- Mahdi Alhamdani**, R. J., & Al-Luaibi, Y. Y. Y. (2020). Detection of *exoA*, *nan1* genes, the biofilm production with the effect of oyster shell and two plant extracts on *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients and their surrounding environment. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11(12).
- Mansor**, M. R., AL-Khalidi, Z. S., Almuhanha, E. H., Hussein, H. R., Almulla, A. F., & Alnaji, H. A. (2023). Detection and Study *nan1* and *tox A* genes of *Pseudomonas aeruginosa* in Isolates from Otitis Media Patients Considered as Virulence Factors. *Iranian Journal of Medical Microbiology*, 17(1), 81–89.
- Marom**, T., Nokso-Koivisto, J., & Chonmaitree, T. (2012). Viral–bacterial interactions in acute otitis media. *Current Allergy and Asthma Reports*, 12(6), 551–558.
- McCarthy**, K. L., & Paterson, D. L. (2017). Increased risk of death with recurrent *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 88(2), 152–157.
- Mcdevitt**, S. (2009). Methyl Red and Voges-Proskauer Test Protocols. *American Society for Microbiology*, 1–9.
- Medina-Blasini**, Y., & Sharman, T. (2020). Otitis externa. StatPearls Publishing, *Treasure Island*, 2023. PMID: 32310515.
- Midhat**, M. S., & Abed, S. M. (2023). Isolation and identification of pathogenic species of the genus *Pseudomonas* and study of antibiotic resistance. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 23(1), 087-098.
- Moehario**, L. H., Tjoa, E., Putranata, H., Joon, S., Edbert, D., & Robertus, T. (2021). Performance of TDR-300B and VITEK® 2 for the identification of *Pseudomonas aeruginosa* in comparison with VITEK®-MS. *Journal of International Medical Research*, 49(2), 0300060521989893.
- Mofatteh**, M. R., Yazdi, Z. N., Yousefi, M., & Namaei, M. H. (2018). Comparison of the recovery rate of otomycosis using betadine and clotrimazole topical treatment. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 84, 404–409.
- Mogrovejo**, D. C., Perini, L., Gostinčar, C., Sepčič, K., Turk, M., Ambrožič-Avguštin, J., & Gunde-Cimerman, N. (2020). Prevalence of antimicrobial

resistance and hemolytic phenotypes in culturable arctic bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 11, 499212.

**Mohamed**, A. H., Sheikh Omar, N. M., Osman, M. M., Mohamud, H. A., Eraslan, A., & Gur, M. (2022). Antimicrobial resistance and predisposing factors associated with catheter-associated UTI caused by uropathogens exhibiting multidrug-resistant patterns: a 3-year retrospective study at a tertiary hospital in Mogadishu, Somalia. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 7(3), 42.

**Mohi-Aldeen**, Z., Essa, M., & Al-Hasso, M. (2018). Detection of Efflux Pumps Genes in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Isolated from Open Fracture Infections. *Kirkuk University Journal-Scientific Studies*, 13(4), 155–169.

**Mohr**, K. I. (2016). History of antibiotics research. How to Overcome the Antibiotic Crisis: Facts, Challenges, Technologies and Future Perspectives. *Springer*, 237–272.

**Monasta**, L., Ronfani, L., Marchetti, F., Montico, M., Vecchi Brumatti, L., Bavcar, A., Grasso, D., Barbiero, C., & Tamburlini, G. (2012). Burden of disease caused by otitis media: systematic review and global estimates. *PloS One*, 7(4), e36226.

**Moradali**, M. F., Ghods, S., & Rehm, B. H. A. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 39.

**Morris**, P. (2012). Chronic suppurative otitis media. *PubMed Central*. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3412293/>.

**Mudaliar**, S. B., & Bharath Prasad, A. S. (2024). A biomedical perspective of pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa*: its applications and challenges. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 40(3), 1–23.

**Muller**, M., & Merrett, N. D. (2014). Pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* confers resistance to ionic silver. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(9), 5492–5499.

**Munita**, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*, 481–511.

- Müsken**, M., Di Fiore, S., Dötsch, A., Fischer, R., & Häussler, S. (2010). Genetic determinants of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm establishment. *Microbiology*, 156(2), 431–441.
- Naik**, P., Pandey, S., Gagan, S., Biswas, S., & Joseph, J. (2021). Virulence factors in multidrug (MDR) and Pan-drug resistant (XDR) *Pseudomonas aeruginosa*: a cross-sectional study of isolates recovered from ocular infections in a high-incidence setting in southern India. *Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection*, 11, 1–11.
- Najm**, R., & Hussein, J. M. (2023). Isolation and Identification of Pathogenic *Escherichia coli* from Different Sources in Najaf Hospital. *Journal of Population Therapeutics and Clinical Pharmacology*, 30(8), 459-464.
- Nampalliwar**, P. P., Khade, A., Waghaye, R., & Mahajan, S. (2023). Isolation and Identification of Soil-Derived *Pseudomonas* Species with Potential Plant Growth Promoting Traits. *International Journal of Innovative Science and Research Technology*, 8(9), 492–499.
- Namuq**, A. O., Ali, K. O. M., & Al-Ani, A. H. (2019). Correlation between biofilm formation, multi-drug resistance and AlgD gene among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences*, 27(3), 143–150.
- Naphtali**, E., Tahir, F., & Agbo, E. B. (2020). Evaluation of activities of some plant leaf extract on typhoidal and non-typhoidal *Salmonella* isolate from selected hospitals in Bauchi, Nigeria. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 11(2), 020-030.
- Nasirmoghadas**, P., Yadegari, S., Moghim, S., Esfahani, B., Fazeli, H., Poursina, F., Hosseininassab, S., & Safaei, H. (2018). Evaluation of Biofilm Formation and Frequency of Multidrug-resistant and Extended Drug-resistant Strain in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Burn Patients in Isfahan. *In Advanced Biomedical Research* ,Vol. 7, Issue 1, p. 61.
- Niekrash**, C. E. (2021). Anatomy of the External Ear. *Applied Head and Neck Anatomy for the Facial Cosmetic Surgeon*, 85–89.



- Nikokar**, I., Tishayar, A., Flakiyan, Z., Alijani, K., Rehana-Banisaeed, S., Hossinpour, M., Amir-Alvaei, S., & Araghian, A. (2013). Antibiotic resistance and frequency of class 1 integrons among *Pseudomonas aeruginosa*, isolated from burn patients in Guilan, Iran. *In Iranian Journal of Microbiology*, Vol. 5, Issue 1, pp. 36–41.
- Numan**, M., Bashir, S., Mumtaz, R., Tayyab, S., Rehman, N. U., Khan, A. L., Shinwari, Z. K., & Al-Harrasi, A. (2018). Therapeutic applications of bacterial pigments: a review of current status and future opportunities. *Biotechnology*, 8, 1–15.
- Olivares**, E., Badel-Berchoux, S., Provot, C., Prévost, G., Bernardi, T., & Jehl, F. (2020). Clinical impact of antibiotics for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections. *Frontiers in Microbiology*, 2894.
- Olsen**, I. (2015). Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34, 877–886.
- Omosigho**, P. O., Emumwen, E. G., Onoja, A. O., Adeleke, A., Otojareri, K. A., Sedenu, A. O., Ekoh, E., & Ezeobi, S. (2019). Bacteriology and Antimicrobial Susceptibility Pattern of Otitis Media in Bida, North Central Nigeria. *Springerplus*, 2015, 1–6.
- Önal**, S., Aridogan, B. C., Gönen, İ., Tas, T., & Kaya, S. (2015). Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical samples and role of quorum sensing signal molecules in the pathogenesis of the disease. *Acta Medica Mediterranea*, 31, 851–856.
- World Health Organization**. (2016). Childhood hearing loss: strategies for prevention and care.
- World Health Organization**. (2019). Ten threats to global health in 2019. Retrieved on September, 22, 2021.
- World Health Organization**. (2022). WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. 2017.

- Özcan, D., & Kahraman, H. (2015).** Pyocyanin production in the presence of calcium ion in *Pseudomonas aeruginosa* and recombinant bacteria. *Turkish Journal of Science and Technology*, 10(1), 13–19.
- Özen, A. I., & Ussery, D. W. (2012).** Defining the *Pseudomonas* genus: where do we draw the line with *Azotobacter*? *Microbial Ecology*, 63, 239–248.
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T.-J., & Cheng, Z. (2019).** Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, 37(1), 177–192.
- Parija, S. C. (2023).** Laboratory Diagnosis of Bacterial Diseases. In *Textbook of Microbiology and Immunology*. Springer, pp. 319–338.
- Pascual, J., García-López, M., Carmona, C., Sousa, T. da S., de Pedro, N., Cautain, B., Martín, J., Vicente, F., Reyes, F., & Bills, G. F. (2014).** *Pseudomonas soli* spp. novel producer of xantholysin congeners. *Systematic and Applied Microbiology*, 37(6), 412–416.
- Paz-Zarza, V. M., Mangwani-Mordani, S., Martínez-Maldonado, A., Álvarez-Hernández, D., Solano-Gálvez, S. G., & Vázquez-López, R. (2019).** *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista Chilena de Infectología*, 36(2), 180–189.
- Pedro Peek, L., Sigalo, B., & Princess B, N. (2018).** Comparing the Efficacy of Kings B, Ceftrimide and Chloramphenicol-nutrient Agar Medium in the Isolation of *Pseudomonas* Species. *Asian Journal of Biological Sciences*, 11(3), 145–151.
- Perez, L. R. R., Machado, A. B. M. P., & Barth, A. L. (2013).** The presence of quorum-sensing genes in *Pseudomonas* isolates infecting cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients. *Current Microbiology*, 66, 418–420.
- Pichichero, M. E. (2013).** Otitis media. *Pediatric Clinics of North America*, 60(2), 391–407.
- Pincus, D. H. (2010).** Microbial identification using the bioMérieux VITEK® 2 system. *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods*, 1–32.

- Pinto, R. M., Soares, F. A., Reis, S., Nunes, C., & Van Dijck, P. (2020).** Innovative strategies toward the disassembly of the EPS matrix in bacterial biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 11, 535344.
- Ponka, D., & Baddar, F. (2014).** Microscopic potassium hydroxide preparation. *Canadian Family Physician*, 60(1), 57.
- Porbaran, M., & Habibipour, R. (2020).** Relationship between Biofilm Regulating Operons and Various  $\beta$ -Lactamase Enzymes: Analysis of the Clinical Features of Infections caused by Non-Fermentative Gram-Negative Bacilli (NFGNB) from Iran. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 14(3).
- Pourakbari, B., Yaslianifard, S., Yaslianifard, S., Mahmoudi, S., Keshavarz-Valian, S., & Mamishi, S. (2016).** Evaluation of efflux pumps gene expression in resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in an Iranian referral hospital. *Iranian Journal of Microbiology*, 8(4), 249.
- Pramodhini, S., Umadevi, S., & Setha, K. S. (2016).** Comparative study of virulence factors among MBL and Non MBL producing urinary isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital. *Indian Journal of Microbiology Research*, 3, 441–445.
- Qin, S., Xiao, W., Zhou, C., Pu, Q., Deng, X., Lan, L., Liang, H., Song, X., & Wu, M. (2022).** *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 199.
- Qing, H., Donde, O. O., Tian, C., Wang, C., Wu, X., Feng, S., Liu, Y., & Xiao, B. (2018).** Novel heterotrophic nitrogen removal and assimilation characteristic of the newly isolated bacterium *Pseudomonas stutzeri* AD-1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 126(3), 339–345.
- Qurban, R., Ain, Q. U. L., Khan, J. K., Naveed, A., Shaheen, A., & Maab, R. (2017).** Bacterial profile of middle ear infections, coexistence of *Pseudomonas*, *Proteus* species in middle ear infections and their antibiotic sensitivity pattern. *Pakistan Postgraduate Medical Journal*, 28(4), 117–121.

- Rajabi, H.,** Salimizand, H., Khodabandehloo, M., Fayyazi, A., & Ramazanzadeh, R. (2022). Prevalence of algD, pslD, pelF, PpgI, and PAPI-1 genes involved in biofilm formation in clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains. *BioMed research international*, 2022(1), 1716087.
- Raksha, L.,** Gangashettappa, N., Shantala, G. B., Nandan, B. R., & Sinha, D. (2020). Study of biofilm formation in bacterial isolates from contact lens wearers. *Indian Journal of Ophthalmology*, 68(1), 23–28.
- Rawat, S.,** Saxena, N., Chad, A., Garg, N., & Sharma, K. (2017). Cinicomycological study of otomycosis with antifungal drug susceptibility testing of *Candida* isolates using disk diffusion method in Kota region, Rajasthan, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6, 3356–3366.
- Reda, F. M.,** El-Zawahry, Y. A., & Omar, A. R. (2017). Synergistic effect of combined antibiotic and methanol extract of *Eucalyptus camaldulensis* leaf against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, 5(4), 486–497.
- Rehman, A.,** Patrick, W. M., & Lamont, I. L. (2019). Mechanisms of ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: new approaches to an old problem. *Journal of Medical Microbiology*, 68(1), 1–10.
- Reichler, S. J.,** Trmčić, A., Martin, N. H., Boor, K. J., & Wiedmann, M. (2018). *Pseudomonas fluorescens* group bacterial strains are responsible for repeat and sporadic postpasteurization contamination and reduced fluid milk shelf life. *Journal of Dairy Science*, 101(9), 7780–7800.
- Reimer, A.** (2000). Concentrations of the *Pseudomonas aeruginosa* toxin pyocyanin in human ear secretions. *Acta Oto-Laryngologica*, 120(543), 86–88.
- Reiner, K.** (2010). Catalase test protocol. *American society for microbiology*, 1(1), 1-9.
- Rewatkar, A. R.** (2013). *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*-Biofilm formation Methods. *The International Organization of Scientific Research Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 8(5), 36–40.

- Rodulfo**, H., Arcia, A., Hernández, A., Michelli, E., Martinez, D. del V., Guzman, M., Sharma, A., & Donato, M. De. (2019). Virulence factors and integrons are associated with MDR and XDR phenotypes in nosocomial strains of *Pseudomonas aeruginosa* in a Venezuelan university hospital. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 61, e20.
- Roohi**, B., Nemati, S., Alipour, A., Faeli, L., Mayahi, S., Haghani, I., Shalchizadeh, M., Darini, A., Al- Hatmi, A. M. S., & Abastabar, M. (2023). Otomycosis: The foremost aetiological agent causing otitis externa and the antifungal susceptibility pattern in North- Western Iran. *Mycoses*, 66(2), 87–97.
- Sadovskaya**, I., Vinogradov, E., Li, J., Hachani, A., Kowalska, K., & Filloux, A. (2010). High-level antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: the *ndvB* gene is involved in the production of highly glycerol-phosphorylated  $\beta$ -(1→3)-glucans, which bind aminoglycosides. *Glycobiology*, 20(7), 895-904.
- Saffari**, M., Karami, S., Firoozeh, F., & Sehat, M. (2017). Evaluation of biofilm-specific antimicrobial resistance genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Farabi Hospital. *Journal of Medical Microbiology*, 66(7), 905–909.
- Sahu**, M. C., Swain, S. K., & Kar, S. K. (2019). Genetically diversity of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from chronic suppurative otitis media with respect to their antibiotic sensitivity pattern. *Indian Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery*, 71, 1300–1308.
- Sami Kassob**, D. (2023). Study of pyocyanin production and biofilm formation in clinical *Pseudomonas aeruginosa*. *In Academic Science Journal* ,Vol. 1, Issue 2, pp. 139–152.
- Sastry, A. S., & Bhat, S. (2018).Essentials of Medical Microbiology. *Jaypee Brothers Medical Publishers*. <https://jaypeebrothers.com/products/9788184481549>.
- Saputra**, K. A. D., Setiawan, E. P., & Pradipta, I. P. Y. (2021). Comparison of cerumen and ofloxacin ear drops bactericidal tests against staphylococcus aureus and pseudomonas aeruginosa bacteria. *International Journal of Medical Reviews and Case Reports*, 5(9), 57.

- Sathe**, N., Beech, P., Croft, L., Suphioglu, C., Kapat, A., & Athan, E. (2023). *Pseudomonas aeruginosa*: Infections and novel approaches to treatment “Knowing the enemy” the threat of *Pseudomonas aeruginosa* and exploring novel approaches to treatment. *Infectious Medicine*, 2(3), 178–194.
- Sawada**, S., Okutani, F., & Kobayashi, T. (2019). Comprehensive detection of respiratory bacterial and viral pathogens in the middle ear fluid and nasopharynx of pediatric patients with acute otitis media. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 38(12), 1199–1203.
- Sayers**, E. W., Cavanaugh, M., Clark, K., Pruitt, K. D., Schoch, C. L., Sherry, S. T., & Karsch-Mizrachi, I. (2022). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D161.
- Scheper**, H., Wubbolts, J. M., Verhagen, J. A. M., De Visser, A. W., Van der Wal, R. J. P., Visser, L. G., De Boer, M. G. J., & Nibbering, P. H. (2021). SAAP-148 eradicates MRSA persists within mature biofilm models simulating prosthetic joint infection. *Frontiers in Microbiology*, 12, 625952.
- Schilder**, A. G. M., Chonmaitree, T., Cripps, A. W., Rosenfeld, R. M., Casselbrant, M. L., Haggard, M. P., & Venekamp, R. P. (2016). Otitis media. *Nature Reviews Disease Primers*, 2(1), 1–18.
- Schindler**, B. D., & Kaatz, G. W. (2016). Multidrug efflux pumps of Gram-positive bacteria. *Drug Resistance Updates*, 27, 1–13.
- Schulze**, A., Mitterer, F., Pombo, J. P., Schild, S. (2021). Biofilms by bacterial human pathogens: Clinical relevance - development, composition and regulation - therapeutical strategies. *Microbial Cell* 8 (2), 28–56.
- Seiffen**, N. L., & Ali, G. H. (2021). Effect of subinhibitory concentrations of selected antibiotics and propolis on pyocyanin and biofilm production among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Alexandria, Egypt. *Egyptian Journal of Medical Microbiology*, 30(4), 129–137.
- Sekhi**, R. J. (2024). Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by bacteriocin produced by *Lactobacillus fermentum*. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 70(182), 9–17.

- Senba, M., & Watanabe, K.** (2015). Possibility of novel therapeutic strategy for multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* using bactericidal activity in *Streptococcus sanguinis* secretion. *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current and Technological Advances A. Medez-Vilas*, 706–713.
- Shakir, D. A., & Lafta, I. J.** (2019). Isolation and Identification of Some Aerobic Bacteria from Solid Tumors of Humans and Animals (Doctoral dissertation, M. Sc. Thesis. University of Baghdad, College of Veterinary Medicine).
- Shariati, A., Azimi, T., Ardebili, A., Chirani, A. S., Bahramian, A., Pormohammad, A., Sadredinamin, M., Erfanimanesh, S., Bostanghadiri, N., & Shams, S.** (2018). Insertional inactivation of *oprD* in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in Tehran, Iran. *New Microbes and New Infections*, 21, 75–80.
- Sharma, A., Gupta, V. K., & Pathania, R.** (2019). Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. *The Indian Journal of Medical Research*, 149(2), 129.
- Sharma, D., Misba, L., & Khan, A. U.** (2019). Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 8(1), 1–10.
- Shaw, E., & Wuest, W. M.** (2020). Virulence attenuating combination therapy: A potential multi-target synergy approach to treat *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis patients. *The Royal Society of Chemistry*, 11(3), 358–369.
- Shawkat, A. A. K. M. S.** (2022). Primary and Secondary Screening of *Pseudomonas aeruginosa* for Protease Production. *Iraqi Journal of Biotechnology*, 21(2).
- Sheikh, A., Shabbir, K., & Imtiaz, A.** (2022). Structure and physiology of human ear involved in hearing. In *Auditory System-Function and Disorders*. IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.105466.
- Shields, P., & Cathcart, L.** (2013). Oxidase Test Protocol - Library. American Society for Microbiology, *American Society for Microbiology Library*, November 2010, 1–5.

- Shlaes**, D. M. (2017). Antibacterial Drugs. In *Infectious Diseases*, Volume 2, pp. 1382-1385.e1. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285-8.00160-X>
- Shukla**, S. K., & Rao, T. S. (2017). An improved crystal violet assay for biofilm quantification in 96-well microtitre plate. *Biorxiv*, 100214.
- Sigurdsson**, G., Fleming, R. M. T., Heinken, A., & Thiele, I. (2012). A systems biology approach to drug targets in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *PLoS One*, 7(4), e34337.
- Silby**, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A. C., Levy, S. B., & Jackson, R. W. (2011). *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*, 35(4), 652–680.
- Singh**, S., Kumar, A., & Kumar, A. (2013). Species identification, antifungal susceptibility testing and genetic variability among *Candida* species isolated from clinical samples. *Journal of Drug Discovery and Therapeutic*, 1(3), 1–11.
- Spalding**, C., Keen, E., Smith, D. J., Krachler, A.-M., & Jabbari, S. (2018). Mathematical modelling of the antibiotic-induced morphological transition of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Computational Biology*, 14(2), e1006012.
- Sperandeo**, P., Martorana, A. M., & Polissi, A. (2019). Lipopolysaccharide biosynthesis and transport to the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Bacterial Cell Walls and Membranes*, 9–37.
- Spilker**, T., Coenye, T., Vandamme, P., & LiPuma, J. J. (2004). PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(5), 2074–2079.
- Stoner**, S. N., Baty, J. J., & Scofield, J. A. (2022). *Pseudomonas aeruginosa* polysaccharide Psl supports airway microbial community development. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 16(7), 1730–1739.
- Sudhoff**, H. H. (2016). Eustachian tube dysfunction, mucosal gas exchange, and effusion. *The chronic ear*, 8-13.



- Sujatha, B.** (2022). A Study on Clinical Profile of the Patients with Malignant Otitis Externa in Tertiary Care Hospital. Stanley Medical College, Chennai. *Journal of Evidence-Based Medicine and Healthcare*, 7(50), 3022-3026
- Sukhorukova, M. V., Edelstein, M. V., Ivanchik, N. V., Skleenova, E. Y., Shajdullina.**(2019). Antimicrobial resistance, carbapenemase production and genotypes of nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Russia. *In Klinicheskaa Mikrobiologia i Antimikrobnaa Himioterapia* ,Vol. 21, Issue 2, pp. 160–170.
- Supriatin, Y., Sumirat, V. A., & Herdiani, M.** (2021). Growth Analysis of escherichia coli and Salmonella typhi on MacConkey Agar Modification. *Journal of Physics: Conference Series*, 1764(1), 12207.
- Swain, S. K., Anand, N., & Sahu, M. C.** (2019). Human cerumen and its antimicrobial properties: Study at a tertiary care teaching hospital of Eastern India. *Annals of Indian Academy of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*, 3(1), 13–16.
- Sweeney, M. T., Lubbers, B. V, Schwarz, S., & Watts, J. L.** (2018). Applying definitions for multidrug resistance, extensive drug resistance and pandrug resistance to clinically significant livestock and companion animal bacterial pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(6), 1460–1463.
- Tan, R. M., Kuang, Z., Hao, Y., & Lau, G. W.** (2014). Type iv pilus of pseudomonasaeruginosa confers resistance to antimicrobial activities of the pulmonary surfactant protein-a. *Journal of Innate Immunity*, 6(2), 227–239.
- Tasić-Otašević, S., Golubović, M., Đenić, S., Ignjatović, A., Stalević, M., Momčilović, S., Bojanović, M., & Arsić-Arsenijević, V.** (2020). Species distribution patterns and epidemiological characteristics of otomycosis in Southeastern Serbia. *Journal de Mycologie Medicale*, 30(3), 101011.
- Thi, M. T. T., Wibowo, D., & Rehm, B. H. A.** (2020). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8671.
- Thomas, J. P., Berner, R., Zahnert, T., & Dazert, S.** (2014). Acute otitis media—a structured approach. *Deutsches Ärzteblatt International*, 111(9), 151.

- Tian, Z.-X., Yi, X.-X., Cho, A., O’Gara, F., & Wang, Y.-P.** (2016). CpxR activates MexAB-OprM efflux pump expression and enhances antibiotic resistance in both laboratory and clinical nalB-type isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathogens*, 12(10), e1005932.
- Timothy, O., Obazee, O. J., Oghama, O. E., & Odaro, J. O.** (2023). Antimicrobial Activities of Chloroform Extract of Whole Plant of *Sida acuta* Burm. f against Selected Clinical Isolates from Laboratory Samples of a Private Hospital in Benin City, Edo State, Nigeria. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 27(10), 2189-2194.
- Todar, K.** (2009). Opportunistic infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Kenneth Todar’s Online Textbook of Bacteriology (K Todar, ed) University of Wisconsin-Madison, Department of Bacteriology, Madison, *WI textbookofbacteriology.net*.
- Tolker- Nielsen, T.** (2014). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: from molecular biofilm biology to new treatment possibilities. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 122, 1–51.
- Tooke, C. L., Hinchliffe, P., Bragginton, E. C., Colenso, C. K., Hirvonen, V. H. A., Takebayashi, Y., & Spencer, J.** (2019).  $\beta$ -Lactamases and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *Journal of Molecular Biology*, 431(18), 3472–3500.
- Tuon, F. F., Dantas, L. R., Suss, P. H., & Tasca Ribeiro, V. S.** (2022). Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: a review. *Pathogens*, 11(3), 300.
- Turnbull, L., & Whitchurch, C. B.** (2014). Motility assay: twitching motility. *Pseudomonas Methods and Protocols*, 73-86.
- Ugwuanyi, F. C., Ajayi, A., Ojo, D. A., Adeleye, A. I., & Smith, S. I.** (2021). Evaluation of efflux pump activity and biofilm formation in multidrug resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a Federal Medical Center in Nigeria. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 20, 1–7.
- Vatan, A., Saltoglu, N., Yemisen, M., Balkan, I. I., Surme, S., Demiray, T., Mete, B., Tabak, F., & Study Group, C. D. F.** (2018). Association between biofilm and

multi/extensive drug resistance in diabetic foot infection. *International Journal of Clinical Practice*, 72(3), e13060.

**Venkatachalam**, G., Gummadi, S., Doble, M., Venkatachalam, G., Gummadi, S., & Doble, M. (2013). Mechanism of Cyclic  $\beta$ -Glucan Production. *Cyclic  $\beta$ -Glucans from Microorganisms: Production, Properties and Applications*, SpringerBriefs in Microbiology. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 71–88.

**Venter**, H., Mowla, R., Ohene-Agyei, T., & Ma, S. (2015). RND-type drug efflux pumps from Gram-negative bacteria: molecular mechanism and inhibition. *Frontiers in Microbiology*, 6, 377.

**Vetrivel**, A., Ramasamy, M., Vetrivel, P., Natchimuthu, S., Arunachalam, S., Kim, G.-S., & Murugesan, R. (2021). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and its control. *Biologics*, 1(3), 312–336.

**Vos**, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K.-H., & Whitman, W. B. (2011). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer Science & Business Media, Volume 3.

**Wang**, Y., Li, X., Chen, H., Yang, X., Guo, L., Ju, R., & Li, G. (2024). Antimicrobial blue light inactivation of *Pseudomonas aeruginosa*: Unraveling the multifaceted impact of wavelength, growth stage, and medium composition. *Journal of Photochemistry and Photobiology: Biology*, 259, 113023.

**Wei**, Q., & Ma, L. Z. (2013). Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(10), 20983–21005.

**Weiner**, L. M., Webb, A. K., Limbago, B., Dudeck, M. A., Patel, J., Kallen, A. J., Edwards, J. R., & Sievert, D. M. (2016). Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 37(11), 1288–1301.

**Wickramasinghe**, N. N., Ravensdale, J., Coorey, R., Chandry, S. P., & Dykes, G. A. (2019). The Predominance of Psychrotrophic *Pseudomonads* on Aerobically

Stored Chilled Red Meat. *In Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol. 18, Issue 5, pp. 1622–1635.

**Wood**, T. K., Knabel, S. J., & Kwan, B. W. (2013). Bacterial persister cell formation and dormancy. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(23), 7116–7121.

**Wu**, J.-F., Jin, Z., Yang, J.-M., Liu, Y.-H., & Duan, M.-L. (2012). Extracranial and intracranial complications of otitis media: 22-year clinical experience and analysis. *Acta Oto-Laryngologica*, 132(3), 261–265.

**Xavier**, D. E., Pico, R. C., Girardello, R., Fehlberg, L. C. C., & Gales, A. C. (2010). Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and  $\beta$ -lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. *BMC Microbiology*, 10.

**Xin**, X.-F., Kvitko, B., & He, S. Y. (2018). *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 316–328.

**Xu**, Z., Fang, X., Wood, T. K., & Huang, Z. J. (2013). A systems-level approach for investigating *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *PloS One*, 8(2), e57050.

**Yang**, W., & Hu, F. (2022). Research updates of plasmid-mediated aminoglycoside resistance 16S rRNA methyltransferase. *Antibiotics*, 11(7), 906.

**Yaseen**, N. N., & Ahmed, D. A. (2023). Detection of mexB Multidrug Efflux Gene in Some Local Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Iraqi Journal of Science*, 64(1), 111–118.

**Yatsyshina**, S., Mayanskiy, N., Shipulina, O., Kulichenko, T., Alyabieva, N., Katosova, L., Lazareva, A., Skachkova, T., Elkina, M., & Matosova, S. (2016). Detection of respiratory pathogens in pediatric acute otitis media by PCR and comparison of findings in the middle ear and nasopharynx. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 85(1), 125–130.

**Yeh**, E., Pinsky, B. A., Banaei, N., & Baron, E. J. (2009). Hair sheep blood, citrated or defibrinated, fulfills all requirements of blood agar for diagnostic microbiology laboratory tests. *PloS One*, 4(7), e6141.

**Yu, S., Wei, Q., Zhao, T., Guo, Y., & Ma, L. Z. (2016).** A survival strategy for *Pseudomonas aeruginosa* that uses exopolysaccharides to sequester and store iron to stimulate Psl-dependent biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(21), 6403–6413.

**Zatakiya, R., Pandya, Y., & Patel, C. (2022).** Clinical and microbiological profiles of infections with *Pseudomonas aeruginosa* at a tertiary care teaching hospital in rural Gujarat, India. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, 9227-9234.

**Zgurskaya, H. I., López, C. A., & Gnanakaran, S. (2015).** Permeability barrier of Gram-negative cell envelopes and approaches to bypass it. *ACS Infectious Diseases*, 1(11), 512–522.

**Zhang, L., Hinz, A. J., Nadeau, J.-P., & Mah, T.-F. (2011).** *Pseudomonas aeruginosa* tssC1 links type VI secretion and biofilm-specific antibiotic resistance. *Journal of Bacteriology*, 193(19), 5510–5513.

**Zhang, A., Anderson, D., Shakhmurov, V., Simonsen, N., Leung, K. H., &**

الملاحق

---

# Appendices

ملحق 1: نتائج فحص الفايتهك لبعض عزلات الزائفه الزنجارية المشخصة في هذه الدراسة:

Organism Quantity:

Selected Organism : *Pseudomonas aeruginosa*

(1)

Source:

Collected:

|           |  |
|-----------|--|
| Comments: |  |
|           |  |
|           |  |

|                            |  |                               |
|----------------------------|--|-------------------------------|
| Identification Information | Analysis Time: 5.83 hours                      | Status: Final                 |
| Selected Organism          | 99% Probability<br>Bionumber: 0003053003500250 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| ID Analysis Messages       |  |                               |

| Biochemical Details |       |   |    |      |   |    |       |     |    |       |   |    |       |   |    |       |   |
|---------------------|-------|---|----|------|---|----|-------|-----|----|-------|---|----|-------|---|----|-------|---|
| 2                   | APPA  | - | 3  | ADO  | - | 4  | PyrA  | -   | 5  | IARL  | - | 7  | dCEL  | - | 9  | BGAL  | - |
| 10                  | H2S   | - | 11 | BNAG | - | 12 | AGLTp | -   | 13 | dGLU  | + | 14 | GGT   | + | 15 | OFF   | - |
| 17                  | BGLU  | - | 18 | dMAL | - | 19 | dMAN  | (-) | 20 | dMNE  | + | 21 | BXYL  | - | 22 | BAlap | + |
| 23                  | ProA  | + | 26 | LIP  | + | 27 | PLE   | -   | 29 | TyrA  | - | 31 | URE   | - | 32 | dSOR  | - |
| 33                  | SAC   | - | 34 | dTAG | - | 35 | dTRE  | -   | 36 | CIT   | + | 37 | MNT   | + | 39 | 5KG   | - |
| 40                  | ILATk | + | 41 | AGLU | - | 42 | SUCT  | +   | 43 | NAGA  | - | 44 | AGAL  | - | 45 | PHOS  | - |
| 46                  | GlyA  | - | 47 | ODC  | - | 48 | LDC   | -   | 53 | IHISa | - | 56 | CMT   | + | 57 | BGUR  | - |
| 58                  | O129R | + | 59 | GGAA | - | 61 | IMLTa | +   | 62 | ELLM  | - | 64 | ILATa | - |    |       |   |

Organism Quantity:

Selected Organism : *Pseudomonas aeruginosa*

Source:

Collected:

|           |  |
|-----------|--|
| Comments: |  |
|           |  |
|           |  |

|                            |  |                               |
|----------------------------|--|-------------------------------|
| Identification Information | Analysis Time: 4.82 hours                      | Status: Final                 |
| Selected Organism          | 99% Probability<br>Bionumber: 0003053001500000 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| ID Analysis Messages       |  |                               |

| Biochemical Details |       |   |    |      |   |    |       |   |    |       |   |    |       |   |    |       |   |
|---------------------|-------|---|----|------|---|----|-------|---|----|-------|---|----|-------|---|----|-------|---|
| 2                   | APPA  | - | 3  | ADO  | - | 4  | PyrA  | - | 5  | IARL  | - | 7  | dCEL  | - | 9  | BGAL  | - |
| 10                  | H2S   | - | 11 | BNAG | - | 12 | AGLTp | - | 13 | dGLU  | + | 14 | GGT   | + | 15 | OFF   | - |
| 17                  | BGLU  | - | 18 | dMAL | - | 19 | dMAN  | - | 20 | dMNE  | + | 21 | BXYL  | - | 22 | BAlap | + |
| 23                  | ProA  | + | 26 | LIP  | + | 27 | PLE   | - | 29 | TyrA  | - | 31 | URE   | - | 32 | dSOR  | - |
| 33                  | SAC   | - | 34 | dTAG | - | 35 | dTRE  | - | 36 | CIT   | + | 37 | MNT   | - | 39 | 5KG   | - |
| 40                  | ILATk | + | 41 | AGLU | - | 42 | SUCT  | + | 43 | NAGA  | - | 44 | AGAL  | - | 45 | PHOS  | - |
| 46                  | GlyA  | - | 47 | ODC  | - | 48 | LDC   | - | 53 | IHISa | - | 56 | CMT   | - | 57 | BGUR  | - |
| 58                  | O129R | - | 59 | GGAA | - | 61 | IMLTa | - | 62 | ELLM  | - | 64 | ILATa | - |    |       |   |

(2)

Organism Quantity:  
 Selected Organism : *Pseudomonas aeruginosa*

Source:

Collected:

|           |  |
|-----------|--|
| Comments: |  |
|           |  |
|           |  |

|                            |  |                               |
|----------------------------|--|-------------------------------|
| Identification Information | Analysis Time: 5.83 hours                      | Status: Final                 |
| Selected Organism          | 99% Probability<br>Bionumber: 0003053103500250 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| ID Analysis Messages       |  |                               |

| Biochemical Details |       |   |    |      |   |    |       |   |    |       |   |    |       |   |    |       |   |
|---------------------|-------|---|----|------|---|----|-------|---|----|-------|---|----|-------|---|----|-------|---|
| 2                   | APPA  | - | 3  | ADO  | - | 4  | PyrA  | - | 5  | IARL  | - | 7  | dCEL  | - | 9  | BGAL  | - |
| 10                  | H2S   | - | 11 | BNAG | - | 12 | AGLTp | - | 13 | dGLU  | + | 14 | GGT   | + | 15 | OFF   | - |
| 17                  | BGLU  | - | 18 | dMAL | - | 19 | dMAN  | - | 20 | dMNE  | + | 21 | BXYL  | - | 22 | BAIap | + |
| 23                  | ProA  | + | 26 | LIP  | + | 27 | PLE   | - | 29 | TyrA  | + | 31 | URE   | - | 32 | dSOR  | - |
| 33                  | SAC   | - | 34 | dTAG | - | 35 | dTRE  | - | 36 | CIT   | + | 37 | MNT   | + | 39 | SKG   | - |
| 40                  | ILATk | + | 41 | AGLU | - | 42 | SUCT  | + | 43 | NAGA  | - | 44 | AGAL  | - | 45 | PHOS  | - |
| 46                  | GlyA  | - | 47 | ODC  | - | 48 | LDC   | - | 53 | IHISa | - | 56 | CMT   | + | 57 | BGUR  | - |
| 58                  | O129R | + | 59 | GGAA | - | 61 | IMLTa | + | 62 | ELLM  | - | 64 | ILATa | - |    |       |   |

(۳)

Organism Quantity:  
 Selected Organism : *Pseudomonas aeruginosa*

Source:

Collected:

|           |  |
|-----------|--|
| Comments: |  |
|           |  |
|           |  |

|                            |  |                               |
|----------------------------|--|-------------------------------|
| Identification Information | Analysis Time: 5.80 hours                      | Status: Final                 |
| Selected Organism          | 98% Probability<br>Bionumber: 0003053303500200 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| ID Analysis Messages       |  |                               |

| Biochemical Details |       |   |    |      |   |    |       |   |    |       |   |    |       |   |    |       |   |
|---------------------|-------|---|----|------|---|----|-------|---|----|-------|---|----|-------|---|----|-------|---|
| 2                   | APPA  | - | 3  | ADO  | - | 4  | PyrA  | - | 5  | IARL  | - | 7  | dCEL  | - | 9  | BGAL  | - |
| 10                  | H2S   | - | 11 | BNAG | - | 12 | AGLTp | - | 13 | dGLU  | + | 14 | GGT   | + | 15 | OFF   | - |
| 17                  | BGLU  | - | 18 | dMAL | - | 19 | dMAN  | - | 20 | dMNE  | + | 21 | BXYL  | - | 22 | BAIap | + |
| 23                  | ProA  | + | 26 | LIP  | + | 27 | PLE   | - | 29 | TyrA  | + | 31 | URE   | + | 32 | dSOR  | - |
| 33                  | SAC   | - | 34 | dTAG | - | 35 | dTRE  | - | 36 | CIT   | + | 37 | MNT   | + | 39 | SKG   | - |
| 40                  | ILATk | + | 41 | AGLU | - | 42 | SUCT  | + | 43 | NAGA  | - | 44 | AGAL  | - | 45 | PHOS  | - |
| 46                  | GlyA  | - | 47 | ODC  | - | 48 | LDC   | - | 53 | IHISa | - | 56 | CMT   | + | 57 | BGUR  | - |
| 58                  | O129R | - | 59 | GGAA | - | 61 | IMLTa | - | 62 | ELLM  | - | 64 | ILATa | - |    |       |   |

(۴)



Organism Quantity:  
 Selected Organism : *Pseudomonas aeruginosa*

Source:

Collected:

|           |  |
|-----------|--|
| Comments: |  |
|           |  |
|           |  |

|                            |  |                               |
|----------------------------|--|-------------------------------|
| Identification Information | Analysis Time: 5.83 hours                      | Status: Final                 |
| Selected Organism          | 96% Probability<br>Bionumber: 4003453103500250 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| ID Analysis Messages       |  |                               |

| Biochemical Details |       |   |    |      |   |    |       |   |    |       |   |    |       |   |    |       |   |
|---------------------|-------|---|----|------|---|----|-------|---|----|-------|---|----|-------|---|----|-------|---|
| 2                   | APPA  | - | 3  | ADO  | - | 4  | PyrA  | + | 5  | IARL  | - | 7  | dCEL  | - | 9  | BGAL  | - |
| 10                  | H2S   | - | 11 | BNAG | - | 12 | AGLTp | - | 13 | dGLU  | + | 14 | GGT   | + | 15 | OFF   | - |
| 17                  | BGLU  | - | 18 | dMAL | - | 19 | dMAN  | + | 20 | dMNE  | + | 21 | BXYL  | - | 22 | BAlap | + |
| 23                  | ProA  | + | 26 | LIP  | + | 27 | PLE   | - | 29 | TyrA  | + | 31 | URE   | - | 32 | dSOR  | - |
| 33                  | SAC   | - | 34 | dTAG | - | 35 | dTRE  | - | 36 | CIT   | + | 37 | MNT   | + | 39 | 5KG   | - |
| 40                  | ILATk | + | 41 | AGLU | - | 42 | SUCT  | + | 43 | NAGA  | - | 44 | AGAL  | - | 45 | PHOS  | - |
| 46                  | GlyA  | - | 47 | ODC  | - | 48 | LDC   | - | 53 | IHISa | - | 56 | CMT   | + | 57 | BGUR  | - |
| 58                  | O129R | + | 59 | GGAA | - | 61 | IMLTa | + | 62 | ELLM  | - | 64 | ILATa | - |    |       |   |

(5)

Organism Quantity:  
 Selected Organism : *Pseudomonas aeruginosa*

Source:

Collected:

|           |  |
|-----------|--|
| Comments: |  |
|           |  |
|           |  |

|                            |  |                               |
|----------------------------|--|-------------------------------|
| Identification Information | Analysis Time: 4.88 hours                      | Status: Final                 |
| Selected Organism          | 97% Probability<br>Bionumber: 0003453143500050 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| ID Analysis Messages       |  |                               |

| Biochemical Details |       |   |    |      |   |    |       |   |    |       |   |    |       |   |    |       |   |
|---------------------|-------|---|----|------|---|----|-------|---|----|-------|---|----|-------|---|----|-------|---|
| 2                   | APPA  | - | 3  | ADO  | - | 4  | PyrA  | - | 5  | IARL  | - | 7  | dCEL  | - | 9  | BGAL  | - |
| 10                  | H2S   | - | 11 | BNAG | - | 12 | AGLTp | - | 13 | dGLU  | + | 14 | GGT   | + | 15 | OFF   | - |
| 17                  | BGLU  | - | 18 | dMAL | - | 19 | dMAN  | + | 20 | dMNE  | + | 21 | BXYL  | - | 22 | BAlap | + |
| 23                  | ProA  | + | 26 | LIP  | + | 27 | PLE   | - | 29 | TyrA  | + | 31 | URE   | - | 32 | dSOR  | - |
| 33                  | SAC   | - | 34 | dTAG | - | 35 | dTRE  | + | 36 | CIT   | + | 37 | MNT   | + | 39 | 5KG   | - |
| 40                  | ILATk | + | 41 | AGLU | - | 42 | SUCT  | + | 43 | NAGA  | - | 44 | AGAL  | - | 45 | PHOS  | - |
| 46                  | GlyA  | - | 47 | ODC  | - | 48 | LDC   | - | 53 | IHISa | - | 56 | CMT   | - | 57 | BGUR  | - |
| 58                  | O129R | + | 59 | GGAA | - | 61 | IMLTa | + | 62 | ELLM  | - | 64 | ILATa | - |    |       |   |

(6)

| احتمالية التشخيص | رقم العزلة  | ت |
|------------------|---|---|
| %99              | Ps1, Ps٢, Ps٣, Ps٤, Ps٩, Ps١٠, Ps11, Ps13, Ps14, Ps15, Ps17, Ps19, Ps20, Ps21, Ps22, Ps23, Ps24, Ps25, Ps26, Ps27, Ps28, Ps29, Ps30 | 1 |
| %98              | Ps٥   | 2 |
| %96              | Ps٦   | 3 |
| %97              | Ps٧, Ps٨, Ps12  | 4 |
| %95              | Ps18  | 5 |
| %91              | Ps16  | 6 |

ملحق ٢: تشخيص بكتيريا *P.aeruginosa* باستخدام جهاز vitek 2

Ear infections are a common clinical issue worldwide and the leading cause of hearing loss in the world. 110 swabs were collected from patients with ear infections at the Ear, Nose, and Throat practice at Imam Hussein Medical City and private clinics in different areas of the Holy Governorate of Karbala, their ages ranged from 1-75 year for the period from August 2023 to October 2023.

The results revealed that 97 (88.18%) isolates showed microbial growth, of which 85 (87.63%) isolates showed bacterial growth and 12 (12.37%) isolates showed fungal growth. The fungal isolates were *Candida spp.* and *Aspergillus spp.* with 10 (83.33%) and 2 (16.67%) isolates, respectively.

Of the total bacterial isolates, which showed Gram-negative bacteria were more common than Gram-positive bacteria with 67 (67.63%) isolates including 35 (41.18%) isolates belonging to the genus *Pseudomonas spp.*. Moreover, the other genera belonging to Gram-negative isolates included *Escherichia spp.*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.* and *Burkholderia spp.* with 11 (12.94%), 10 (11.76%), 7 (8.24%) and 2 (2.35%) isolates respectively. *Bordetella spp.* and *Stenotrophomonas spp.* with one isolate (1.18%) for each bacterial genus. Gram-positive bacterial isolates included 18 (21.18%) isolates belonging to the genus *Staphylococcus spp.*

This study identified three bacterial species in the Vitek 2 compact system, namely *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* with 30 (35.29%), 3 (3.53%) and 2 (2.35%) isolates, respectively. Polymerase chain reaction (PCR) results using the *16s rRNA* gene confirmed that

all *P. aeruginosa* isolates carried this gene. The study highlighted that *P. aeruginosa* is the common bacterial species among the microorganisms causing ear infections. The Vitek 2 compact system was used to determine the sensitivity of the *P. aeruginosa* isolates to 12 antibiotics, 96.67% of the isolates were resistant to both Ticarcillin and Ticarcillin/Clavulanic acid. In addition, 93.33% of them were resistant to Piperacillin, Ceftazidime and Cefepime, 90% of these isolates showed resistance to Gentamicin and Imipenem. 86.67% of the bacterial isolates were resistant to both Tobramycin, Ciprofloxacin and Meropenem. Moreover, the bacteria showed resistance (80 and 20%) to Amikacin and Colistin respectively.

Some virulence factors of *P. aeruginosa* isolates were examined, the results indicated that 24 (80%) of the isolates produced Pyocyanin, 23 (76.67%) isolates produced protease and 20 (66.67%) isolates produced hemolysin. The study also revealed that each of the tested *P. aeruginosa* isolates had the ability to produce biofilms according to both qualitative and quantitative methods. In the qualitative detection, 6 (20%) isolates were identified as strong biofilm producers, 8 (26.67%) as moderate producers and 16 (53.33%) as weak producers. The quantitative assay results showed that 12 (40%) isolates were strong biofilm producers, 15 (50%) isolates were moderate producers, and 3 (10%) isolates were weak producers. In addition to the phenotypic examination of biofilm production, molecular detection using polymerase chain reaction (PCR) revealed that 7 (23.33%) and 15 (50%) isolates carried the *psIA* and *psID* biofilm formation genes respectively.

On the other hand, molecular detection showed that all 30 (100%) isolates of *P. aeruginosa* contain both *ndvB* and *tssCI* genes that are involved in biofilm-specific antibiotic resistance. The development of biofilms is closely related to the activity of efflux pumps. The detection of efflux pumps in 30 bacterial isolates of *P. aeruginosa* was performed using the Ethidium Bromide-Agar Cartwheel method

as a guide for phenotypic detection. The results revealed that 23 (76.67%) bacterial isolates were positive for phenotypic detection. This was based on the lowest concentration at which the isolates did not show fluorescence under Ultraviolet (UV) light source. These results were confirmed on the molecular level using PCR detections. As 17 (56.67%) of the *P. aeruginosa* isolates carried the *mexB* gene, the gene encodes to one of the three proteins that form mexAB-oprM system. The latter belongs to the family of resistance-nodulation divisions (RND).

Molecular modeling results indicated that the predicted structure of adenylate kinase (Adk) in *P.aeruginosa* is divided into three functional subdomains namely the core subdomain, the AMP-binding subdomain (AMP<sub>bd</sub>), and the ATP-binding subdomain (LID). After that, the model was verified by MolProbity version 4.4 with high rate of confidence.



University of Kerbala  
College of Science  
Department of Biology

**Phenotypic and molecular characterization of some virulence factors  
in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from ear infection patients in  
sacred Kerbala province**

A Thesis

Submitted to the council of the College of Science – University of Kerbala In  
Partial of Fulfillment of Requirements for the Master Degree in Biology

**Written By:**

Zeina Haider Abbas

B.Sc. Biology (20٢٠) \University of Kerbala

**Supervised by:**

Lecturer Dr.Aziz Yasir Hasan Al-Ethari

December-٢٠٢٤ A.D.

Jumada Al-Akhir-١٤٤6 A.H.