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

محمد فرج المرجاني و نبراس رضا محمد

قسم علوم الحياة/ كلية العلوم / الجامعة المستنصرية

Multi Drug resistance in Colistin resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates and detection of MexXY efflux pump gene

Mohammed F. AL- Marjan and Nebras R. Mohammed

Department of Biology – College of Science - AL- Mustansiriya University, Baghdad- Iraq

Abstract

One Hundred and Twenty isolates of *Pseudomonas aeruginosa* were collected from different samples during the period August /2014 to January /2010 .

Sensitivity of isolates was tested against colistin , results revealed that 27 isolates(22.5%) were resistat to colistin.The colistin resistant isolates were tested against 12 different antibiotics ,the results showed that all isolates were resistance to amoxicillin and carpencillin .Norfloxacin , Levofloxacin and Ciprofloxacin were found to be the most effective agents against the isolates. On the other hand the results showed that all isolates were able to produce hemolysin and biofilm formation. Polymerase Chain Reaction (PCR) technique was performed done using specific primer targeting the specific sequences of the *mexY* gene, The results showed that *mexY* found in 75% of isolates.

Keywords:*Pseudomonas aeruginosa*, Colistin resistance, efflux pumps, MexXY.

المستخلص

تم الحصول على ١٢٠ عزلة تعود لبكتريا *P.aeruginosa* من اصابات مختلفة في بعض مستشفيات مدينة بغداد للمدة من شهر أب /٢٠١٤ ولغاية شهر كانون الاول ٢٠١٤ ، تم أختبار حساسية العزلات تجاه مضاد الكولستين، وأظهرت النتائج وجود (27) عزلة مقاومة لهذا المضاد (22.5%) ، من جانب اخر اختبرت العزلات المقاومة للكولستين تجاه أثناعشرة مضادا من مجاميع مختلفة بأستعمال طريقة الأقراص. أظهرت النتائج أن جميع العزلات المختبرة كانت مقاومة لمضادات الاموكسسلين والكاربنسلين، واظهرت بعض العزلات مقاومة عالية لمضادات Gentamycin(70.8%) و Nalidixic acid(79.2%) ، بينما كانت المقاومة الأقل هي لمضادات Norfloxacin(13.3%) و Levofloxacin(12.5%) و Ciprofloxacin (9.0%)

أختبرت قابلية العزلات المقاومة للكولستين على انتاج الهيمولايسين وتكوين الغشاء الحيوي وقد اظهرت النتائج ان جميع العزلات منتجة للهيمولايسين ، وكانت جميع العزلات مكونه للغشاء الحيوي (Biofilm).

أخضعت العزلات المقاومة للكولستين للكشف الجيني عن مضخة الدفق MexXY باستعمال تقنية PCR، وبعد ترحيل ناتج التضاعف في هلام الأكاروز لوحظ ان ٧٥% من العزلات تمتلك الجين*mexY* المشفر لمضخة الدفق اعلاه .

المقدمة

تسبب بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* أمراضا عديدة في جسم الأنسان منها أخماج الجروح والحروق، وأخماج العين و الجلد ، والمجاري البولية ، والأذن الوسطى ، وتجرثم الدم (Bacteremia) ، خاصة عند الأشخاص الذين يعانون من أمراض نقص المناعة والأشخاص المصابين بالأيدز فهي أحد أهم الأنواع البكتيرية المسببة لما يعرف بالأصابات المكتسبة في المستشفيات (1) ، ويعود سبب صعوبة علاج الاصابات بهذه البكتريا الى مقاومتها للعديد من المضادات المايكروبية ومنها مضادات البيتالاكتام (B-lactams) والماكروليد (Macrolids) ، فضلا عن مقاومتها العالية لمضادات فلوروكوينولونات (Flouroquinolones)، مما يجعلها واحدة من أخطر الممرضات وأكثرها أصابة للأنسان (2,3) .

يعد مضاد الكولستين احد المضادات المهمة كعلاج ضد أغلب اصابات العصوية الهوائية السالبة لصبغة كرام وهو قاتل بكتيري (bacteriocidal) ، يعمل على غشاء الخلية البكتيرية من خلال الأرتباط الأولي بالغشاء الخارجي للبكتريا اذ يعمل على ازاحة المغنيسيوم (Mg^{+2}) والكالسيوم (Ca^{+2}) مما يؤثر على أستقرار جزيئة عديد السكريات الشحمي سالب الشحنه ، وبالتالي يؤدي الى عرقلة التوازن الأزموزي وتسرب مكونات الخلية (4) ، وهو يسبب زيادة نفاذية غشاء الخلية ، وتكسير مكونات الخلية ، وبالتالي موت الخلية (5) ، ويعود سبب مقاومة هذه البكتريا لمضاد الكولستين الى الية الضخ البكتيري المعتمد على الطاقة وهو السبب الرئيس لاكتساب الممرضات الأنتهازية للمقاومة المتعددة للمضادات الحيوية (6). يشفر جينوم هذه البكتريا لأنواع من مضخات الدفق المشفر لها كروموسوميا والتي تعود للعائلة (Resistance Nodulation cell-Division RND) ، فضلا عن مضخات الدفق المشفر لها بلازميديا التي تضخ المضادات ، وهذا مايسمى بمضخات الدفق المتعددة MDR-Efflux pumps مثل مضخة الدفق MexAB-OprM ومضخات دفق أخرى مهمة سريريا مثل MexXY و MexCD-OprN (7).

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

المواد وطرائق العمل

العزلات البكتيرية

تم الحصول على١٢٠ عزلة تعود لبكتريا ***P.aeruginosa*** من اصابات مختلفة في بعض مستشفيات مدينة بغداد للمدة من شهر أب /٢٠١٤ ولغاية شهر كانون الاول ٢٠١٤ ، تم التاكد من تشخيص العزلات أعتمادا على الفحوصات المظهرية والكيموحيوية التي وردت في (9).

اختبار حساسية العزلات لمضاد الكولستين

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

اختبار حساسية العزلات المقاومة للكولستين للمضادات الحيوية الاخرى

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

إختبار التحري عن تكوين الغشاء الحيوي (Biofilm)

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

أختبار قابلية العزلات على أنتاج البروتييز

اختبرت قابلية العزلات على انتاج انزيم البروتييز باتباع طريقة (١٢) باستعمال وسط حليب الفرز

الكشف عن قابلية العزلات على أنتاج الهيمولايسين

أختبرت قابلية العزلات البكتيرية على أنتاج الانزيم الحال للدم بزرع وسط اكارالدم الاساس المحضر بلقاح عزلات بكتريا *Ps.aeruginosa* بطريقة التخطيط والطعن في الوسط الزرعي،

حضنت الاطباق في درجة حرارة ٣٧° م لمدة 24 ساعة، لوحظ بعدها تكون مناطق تحلل شفافة حول المستعمرات البكتيرية دلالة على ايجابية الفحص (13).

عزل DNA البكتيري

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

الكشف عن جين مضخة الدفق *mexy* باستعمال تقنية PCR

أختيرت البوادئ النوعية المُستهدفة لجينات *mexy* في بكتـــريا *P. aeruginosa* وفقاً لما ذكر في (١٤) حسب تسلسل البادئ *mexy* 1'5-TGG TCA ACG TCA GCG CCAGCT AT -3' 5-TCGACGATCTTCAGGCGTTCTG-3'mexy2 وبعد انتهاء فترة التضاعف حسب البرنامج المذكور في (١٤) تم الكشف عن نواتج التضاعف بترحيل العينات على هلام الأكاروز المحضر بتركيز (1)% ، حملت العينات بأستعمال داريء التحميل الجاهز فضلا عن ترحيل DNA Ladder . ثم رحلت النواتج و DNA Ladder كهربائيا لمدة (45) دقيقة ، فحص الهلام بعد أنتهاء الترحيل من خلال تعريضه لمصدر الأشعة فوق البنفسجية وتم تقدير الأحجام الجزيئية للقطع المتضاعفة مقارنة بموقع الحزم في DNA Ladder المستعمل ، والمرحل مع نواتج التضاعف.

النتائج والمناقشة

تم الحصول على١٢٠ عزلة تعود لبكتريا ***P.aeruginosa*** من اصابات مختلفة في بعض مستشفيات مدينة بغداد للمدة من شهر أب /201٤ ولغاية شهر كانون الاول ٢٠١٤ (جدول 1) .

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

نوع العينات	عدد عزلات بكتريا *P. aeruginosa*
الأدرار	33
أخماج الحروق	25
القشع	25

أخماج الجروح	**17**
الدم	**12**
الأذن	**5**
أدوات القثطرة البولية	**3**
المجموع الكلي	**120**

أختبرت حساسية عزلات الدراسة البالغة (120) عزلة أتجاه مضاد الكولستين وأظهرت النتائج وجود (27) عزلة مقاومة للكولستين (22.5%) بأستعمال طريقة الأقراص . لاتتفق نتائج الدراسة الحالية مع الباحث (١٥) أذ وجد أن عزلات *P.aeruginosa* المقاومة للكولستين هي فقط ٦% .

من جانب اخر اختبرت العزلات المقاومة للكولستين (اضافة الى ٢١ عزلة حساسة له) تجاه أثناعشرة مضادا من مجاميع مختلفة بأستعمال طريقة الأقراص.

أظهرت النتائج أن جميع العزلات في هذه الدراسة كانت مقاومة لمضادات الاموكسسلين والكاربنسلين، بينما اظهرت بعض العزلات مقاومة عالية لمضادات , Gentamycin(70.8%) Nalidixic acid(79.2%) Tobramycin(56.3%) ,Lomefloxacin(58.3%) ، وكانت المقاومة الأقل هي لمضادات Ofloxacin(27.0%) ، Aztreonam(18.8%) ، Levofloxacin(12.5%) ، Norfloxacin(13.3%) ، Polymyxin B (18.7%), Ciprofloxacin (9.0%) ، (جدول ٢).

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

المضاد المايكروبي	**الرمز**	**نسبة % المقاومة**
Amoxcillin	AX	100
Carbencillin	PY	100
Aztreonam	ATM	18.8
Gentamycin	CN	70.8
Tobramycin	TOB	56.3
Polymyxin B	PB	18.7
Norfloxacin	NOR	13.3

58.3	LOM	Lomefloxacin
9.0	CIP	Ciprofloxacin
12.5	LEV	Levofloxacin
27.0	OFX	Ofloxacin
79.2	NA	Nalidixic acid

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن هناك مقاومة عالية أبدتها عزلات بكتريا *P.aeruginosa* لمضادات البيتالاكتام والمتمثلة بالمضاد الاموكسسلين وقد كانت نتائج الدراسة الحالية متفقة مع النتائج التي حصل عليها (١٦) أذ كانت نسبة المقاومة لمضادات الأموكسسلين 100% .

أما مجموعة الأمينوكلايكوسيدية التي شملت كل من مضاد Gentamycin و Tobramycin فقد بلغت نسبة المقاومة لها في هذه الدراسة 70.8% و 56.3% على التوالي وجاءت نتائج الدراسة مقاربة لما توصلت اليه (١٧)التي أشارت الى أن نسبة مقاومة العزلات لمضاد Tobramycin هي 46% وقد بينت (١٨) أن نسبة مقاومة بكتريا *P.aeruginosa* لمضاد Gentamycin هي 66% وهي مقاربة للنتيجة التي تم التوصل اليها في هذه الدراسة . تعود مقاومة البكتريا لمضادات الأمينوكلايكوسيدية الى أفراز البكتريا لأنزيمات Aminoglycoside modifying enzyme (AMEs)(6) . من جانب اخر بالنسبة لمضادات الكوينولونات نجد أن المضادات الحيوية أوفلوكساسين و نورفلوكساسين (من مجموعة فلوروكوينولونات) قد أظهرت فعالية جيدة ضد عزلات بكتريا *P.aeruginosa*أذ كانت نسبة العزلات الحساسة للمضاد Ofloxacin (43.8%) وهو من بين أنواع المضادات الحيوية الأكثر تأثيرا على العزلات قيد الدراسة أذ أظهرت النتائج أن جميع العزلات كانت حساسة له عدا (13)عزلة فقط كانت مقاومة . أما بالنسبة لمضاد نورفلوكساسين فكانت نسبة المقاومة منخفضة فكانت النسبة المقاومة (13.3%) . أما مضاد Ciprofloxacin فقد أظهرت الدراسة الحالية أنخفاضا نسبيا في مستوى المقاومة له والتي كانت (9%) وكانت هذه النتائج مقاربة لما حصل عليه الباحث (19)الذي وجد أن نسبة المقاومة لهذا المضاد (19%).

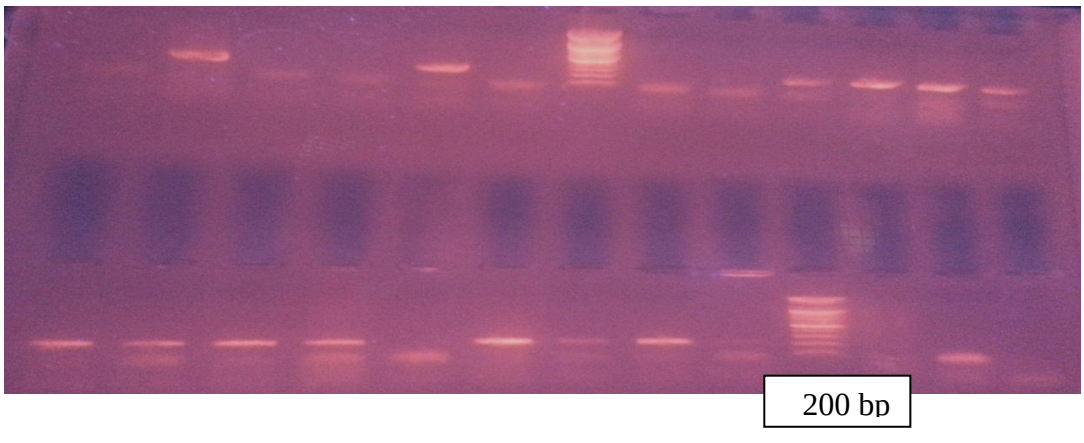
أما أعلى نسبة مقاومة لوحظت في مضادات الكوينولونات هي لمضاد Nalidixic acid أذ و بنسبة (79.2%) وقد يرجع سبب ذلك لكونه أول مضاد أكتشف من مجموعة الكوينولونات حيث أن كثرة الأستخدام لهذا المضاد جعل من البكتريا تتمكن من مقاومة هذا المضاد أما من خلال المقاومة المكتسبة أو الذاتية لها وتتفق النتيجة مع دراسة (٢٠) أذ حصلت الباحثة على مقاومة تامة لمضاد Nalidixic acid في دراستها على بعض أنواع البكتريا السالبة لصبغة كرام .

أختبرت قابلية العزلات المقاومة للكولستين لأنتاجها أنزيم الهيمولايسين وقد اظهرت النتائج ان جميع العزلات منتجة لهذا الأنزيم بنسبة 100% ، يعد أنتاج الهيمولايسين من عوامل الضراوة المهمة لهذه البكتريا أذ يعمل على تحليل كريات الدم الحمراء Erythrocyte مسببا فقر الدم anemia وضعف دفاعات المضيف وبذلك يوفر كميات كبيرة من الحديد الذي تستفيد منه البكتريا في الفعاليات الأيضية وأن أنتاج الهيمولايسين يسبب تحطيم الأنسجة ويسهل أنتشار البكتريا وتحرير مغذيات المضيف (21) .

وأختبرت هذه العزلات على أنتاجها للغشاء الحيوي وكانت جميع العزلات المقاومة للكولستين منتجة للغشاء الحيوي ، تتفق هذه النتائج (٢٢) الذي بين أن 72.7% من العزلات أعطت مستعمرات سوداء اللون على وسط أحمر كونغو بينما 27.2% من العزلات أعطت مستعمرات وردية اللون دليل على عدم تكوينها للغشاء الحيوي .

وأختبرت العزلات المقاومة للكولستين لأنتاجها أنزيم البروتييز واظهرت النتائج ان جميع العزلات المختبرة كانت منتجة لأنزيم البروتييز ، تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ماتوصل اليه (٢٣) الذي أشار الى أن (86.1%) من سلالات *P.aeruginosa* لها القابلية على أنتاج أنزيم البروتييز القاعدي .

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



الشكل (1) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR لبكتريا *P.aeruginosa* بأستعمال الباديء النوعي لجين

mexA، بعد صبغها بصبغة الأثيديوم بروميد وتعريضها للأشعة فوق البنفسجية . تركيز الهلام 1% ، الفولتية (50) فولت لمدة 45/دقيقة ، الدليل الحجمي 10kb .

أظهرت النتائج أن (75%) من العزلات تمتلك الجين*mexY*، تتفق نتائج الدراسة مع ماتوصل اليه (24) ، أذ لاحظوا أن 39عزلة (45.9%) من عزلات *P.aeruginosa* تملك الجين *mexY* . تعمل مضخة الدفق على منح الخلايا البكتريه مقاومة متعددة لمدى واسع من المركبات مثل الكوينولونات ومركبات الامونيوم الرباعية وصبغة الإثيديوم بروميد والاكردين.

المصادر

1) **Vianelli** ,N.; Giannini, M.B and Quartic , C .(2006). Resolution of *Pseudomonasauerоginosa* Outbreak in a haematology unit with the use of disposable sterile water filter . Haematol,J;91(7):983-985.
2) **Landman**, D.; Quale , J.M. ; Mayorga, D., et al.(2002). Citywide clonal Outbreak of multi-resistant *Acinetobacterbaumanni* and *Pseudomonas aeruginosa*in Brooklyn ,N Y : the pre antibiotic era has returned .Arch. Intern. Med. 162 : 1515-1520 .
3) **Vidaillac**, C.; Benichou , L. and Duval , R.E.(2012). In vitro synergy of colistin Combinations against Colistn –Resistant *Acinetobacterbaumanni*, *Pseudomonas aeruginosa*and *Klebsiella pneumonia* isolates. Antimicrob.Agents Chemother. 56(9):4856-4861.
4) **Lambert**,P.A.(2002). Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* . J .Royal.Soc .Med95: 22-26.
5) **Falagas**, M.E.; Kasiakou , S.K.(2005). Colistin : The revival of polymyxin for the Management of Multi-drug-Resistant Gram-

Negative Bacterial Infections. Clin. Infect. Dis. .editor Louis, D. and saravolatz .

6) **Morita**,Y. ; Sobel ,M.L. and Poole, K.(2006). Antibiotic Inducibility of the MexXY Multidrug Efflux System , Department of Microbiology and Immunology ,Queen's University , Kingston , Ontario ,Canada k7L 3N6.

7) **Meletis** ,G. and Bagkeri , M. (2013) . *Pseudomonas aueroginosa* :Multi –Drug- Resistance Development and Treatment options.edited bySilpiBasak .J.Med. Infect. Dis. ISNB 978-95351-1145

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

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

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

11) **Mathur**, T.; S. Singhal; S. Khan; D.J. Upadhyay; T. Fatma; and A. Rattan. 2006. Detection of Biofilm Formation among The Clinical Isolates of Staphylococci: An Evaluation of Three Different Screening Methods. Indian J. Med. Microbiol. 24(1):25-29.

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

13) **Atlas** R.M.; Brown,A.E.; and Parks,L.C.(1995) Laboratory Manual Experimental Microbiology. 1th ed. Mosby Yearbook, Inc. P: 888

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

15) **Mohanty**,S.;Maurya,V.;Gaind,R.;Deb,M.(2013).Phenotypic characteriza- tion and colistinscsceptibillities resistance of *Pseudomonasaeruginosa* and *Acienetobacter spp*. . J.Infect. Dev. Ctries. 7(1):880-887.

١٦) **محسن**،مسلم عيدان .(2010). دراسة تأثيرالفوسفات في ضراوة بكترياالزوائف الزنجارية خارج وداخل الجسم الحي .رسالةماجستير. كليةالعلوم . جامعةالكوفة .

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

18) AL-Gherawi, R.S.(2009).Effect of *Cinnamomumzeylanicum* Bark and *Apiumgraveolens* Seed on the antibiotic resistant bacteria isolated from UTI female patients (in vitro) .M.S.C., thesis College of science .Al-Mustansiriya University .

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

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

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

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

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

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