تشخيص بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من عينات سريرية باستخدام جين *16S* rDNA .

Identification of *Pseudomonas aeruginosa* From Clinical Specimen by Using *16S rDNA* Gene.

رنا مجاهد عبدالله عباس فالح مهدي
كلية التربية ابن الهيثم للعلوم الصرفة/ جامعة بغداد

Rana M. Abdullah Abbas F. Mehdi
College of Education Ibn-Al Haitham/ Baghdad University

E-mail: dr.rana_alshwaikh@yahoo.com

الملخص

تم الحصول على 75 عزلة تعود الى بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من اصل 100 عزلة جمعت من حالات مرضية مختلفة. كشف عن وجود جين *16S rDNA* وباستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) ووجد ان 100 % من العزلات تمتلك هذا الجين والذي بلغ حجمه 956 زوج قاعدة. اجري فحص الحساسية للمضادات الحيوية المختلفة حيث كانت جميع العزلات مقاومة لمضاد Kanamycin بنسبة 100%، فيما اظهرت مقاومة اقل لكل من مضادات Ceftazidime بنسبة 81.33%، ولمضاد Gentamicin 46.66% ولمضاد Tobramycin 38.66% ولمضادات Piperacillin و Ofloxacin بنسبة 37.33% لكل منهما، واظهرت العزلات مقاومة بنسبة 34.66 % لكل من مضادي Ciprofloxacin و Norfloxacin، واظهرت العزلات اقل مقاومة لمضاد Aztreonam بنسبة 22.66% ولمضاد Imipenem بنسبة 17.33%. تم التحري عن بعض عوامل الضراوة التي تمتلكها البكتريا، واظهرت النتائج ان جميع العزلات تمتلك الانزيم الحال للدم Hemolysin بنسبة 100%، في حين اظهرت 61 عزلة 81.33% قابليتها على انتاج انزيم المحلل للبروتين Protease، وكانت اغلب العزلات لها قابليه لانتاج صبغة البايوسيانين Pyocyanin بنسبة 78.66% وبلغت نسبة العزلات التي اثبتت قدرتها على انتاج انزيم المحلل للنشا Amylase 78.66 %، اظهرت 54 عزلة 72% قابليتها على انتاج Biofilm.

الكلمات المفتاحية: بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* ، جين *16S rDNA* ، المقاومة للمضادات الحيوية، عوامل الضراوة.

Abstract

Seventy- Five isolates of *Pseudomonas aeruginosa* were isolated from 100 isolates of clinical cases. *16S rDNA* gene was detected by using polymerase chain reaction (PCR) and found that all isolates possess this gene, with 956 base pair. The isolates showed different sensitivity against antibiotics, all isolates were resistant to Kanamycin 100% most of isolate shown resistance to Ceftazidime 81.33%, Gentamicin 46.66 %, Tobramycin 38.66% and Piperacillin and Ofloxacin 37.33% each of them, and some isolates showed less resistance to Ciprofloxacin and Norfloxacin 34.66% each of them, and Aztreonam 22.66% and finally to Imipenem 17.33%. Virulence factors analysis showed 75 (100%) isolates were produced β-hemolytic, 61 (81.33%) were Protease activity, and 59 (78.66%) isolates had Pyocyanin and Amylase, and 54 (72%) isolates showed its ability to produce Biofilm.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa, 16S rDNA*, antibiotics resistance, Virulence factors.

المقدمة

تعد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من انواع البكتريا الواسعة الانتشار وتسبب العديد من الاصابات للانسان والحيوان وتعد من انواع البكتريا المهمة لانها تسبب العديد من الامراض ومن اهم الامراض التي تسببها هذه البكتريا تجرثم الدم حيث وجد ان حوالي 28% من حالات تجرثم الدم يعود لهذه البكتريا وتنتقل عن طريق نقل الاعضاء `organ transplants وتسبب ايضا التليف الحويصلي Cystic fibrosis [1] التهابات قرنية العين Lens Keratitis والتهابات الاذن الخارجية Otitis externa واصابات الرئة وتصيب الاشخاص المصابين بالايدز والسرطان ونقص المناعة وحالات التهابات الجروح والحروق والجلد وتصيب الاشخاص المصابين بتسمم الادوية [2] وقد وجد ان اكثر حالات الاصابة تحدث عن طريق المستشفيات حيث وجد نمو لهذه البكتريا في المحاليل المعقمة ويمكن انتقالها عن طريق الخضراوات والاغذية الملوثة [1].

تمتلك هذه البكتريا مقاومة عالية للمضادات الحيوية المختلفة مما يجعل علاجها صعب اضافة الى امتلاكها الى العديد من عوامل الضراوة ومنها Exotoxin A المسؤول عن تنخر الانسجة وانزيم Exoenzyme S مع بقية عوامل الالتصاق مسؤول عن استقرار التصاق البكتريا بالخلايا المضيفة و Las B elastase و Alkalin protease وبقية انواع Protease المسؤولة عن تحطيم الانسجة و Pyocyanin و Phospholipase C و Rhamolipide و Biofilmes اضافة الى انتاج لانزيم hemolysine [2-4] .

ان طرق تشخيص البكتريا قد يصل الى عدة ايام لذلك لابد من ايجاد طرق سريعة للتشخيص من اجل تحديد العلاج بسرعة وخاصة لانواع البكتريا التي تسبب الاصابات عن طريق المستشفيات، وان اكتشاف تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR واستخدام هذه الطريقة لتشخيص النوع الخاص بالبكتريا بسرعة عن طريق تحديد تسلسل القواعد في شريط DNA للبكتريا [5] وبهذه الطريقة يمكن تشخيص البكتريا المرضية وبالاخص بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* وبالاعتماد على تسلسل القواعد معينة وبالاخص الاعتماد على جين *16SrDNA* والتي تعد من الطرق السريعة والبسيطة والدقيقة من اجل تشخيص هذه البكتريا [6].

البحث مستل من رسالة الماجستير للباحث الثاني

المواد وطرق العمل

عزل وتشخيص البكتريا

جمعت 100 عزلة من حالات مرضية مختلفة تضمنت التهابات (الجروح، الحروق، التهاب المجاري البولية، التهاب الاذن الوسطى، الدم) للفترة من 9/1/ 2014 لغاية 11/30/ 2014 من عدة مستشفيات في بغداد (مستشفى الطفل المركزي، مستشفى مدينة الامامين الكاظمين الطبية، مستشفى ابن البلدي، مستشفى الصدر، مستشفى الحروق والمختبرات التعليمية / مدينه الطب).

تشخيص العزلات

تم تشخيص العزلات باستعمال الطرائق الزرعية باستخدام عدة اوساط زرعية منها وسط MacConkey agar و وسط Blood agar وسط Citrimide agar و وسط Pseudomonas agar واستعمل الفحوصات البايوكيميائية مثل Oxidase و Catalase وكما تم التاكد من الفحوصات البكتيريولوجي باستعمال API 20 E للتشخيص النهائي [7].

عزل DNA

تم استعمال عدة خاصة لاستخلاص DNA من عزلات البكتريا (Geneaid Biotech kit system , UK) وحسب تعليمات الشركة المصنعه .

تشخيص البكتريا

بالاعتماد على وجود جين *16S rDNA* وباستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وبالظروف التفاعلية الموضحة في الجدول ادناة [6]

primer	Primer sequence 5 ⟶ 3	Product size (bp)	PCR condition For 25 cycles
PA-SS-F	GGGGGATCTTCGGACCTCA	956	95 °C 2 min
PA-SS-R	TCCTTAGAGTGCCCACCCG		94 °C 20sec
			58 °C 20sec
			72 °C 40sec
			72 °C 1 min

فصلت نتواتج التفاعل باستخدام الاكاروز بتركيز 1% الحاوي على 5µl من صبغة Eithidium bromide وباستعمال DNA ladder 100bp وبفرق جهد 75 فولت لمدة ساعة وتم التصوير باستخدام UV light.

اختبار فحص الحساسية للمضادات الحيوية

اعتمدت طريقة Kirby baure [8] لاجراء فحص الحساسية للمضادات الحيوية وباستعمال وسط Muller Hinton agar واختبرت مقاومة العزلات للمضادات الحيوية Norfloxacin، Ofloxacin، Ciprofloxacin، Kanamycin، Tobramycin، Gentamicin، Aztreonam، Imipenem، Piperacillin، Ceftazidime، وتمت مقارنة النتائج مع الجداول القياسية المذكورة في [9] لتحديد قطر منطقة التثبيط.

التحري عن العزلات المنتجة لانزيم الهيموලايسين Hemolysin

تم زرع العزلات على وسط الدم الحاوي على 5% دم من فصيلة (AB) بطريقة التخطيط وحضنت في درجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة وبعدها تم ملاحظة منطقة التحلل حول المستعمرة [10].

التحري عن العزلات البكتيرية المنتجة لانزيم الحال للبروتين Protease

استعمل وسط اكار الحليب الفرز 10% ونقلت المستعمرات النقية الى وسط الحليب وحضنت مدة 24 ساعة بدرجة 37 م وقيست قطر منطقة التحلل [11].

التحري عن العزلات المنتجة لصبغة البايوسيانين Pyocyanin

زرع وسط اكار مولر- هنتون بمستعمرات فتية بعمر 18 – 24 ساعة، ثم حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37م ولمدة 24 ساعة. واستخدم هذا الوسط لملاحظة انتاج البكتريا لصبغة البايوسيانين وهي احدى الصفات التشخيصية المهمة لبكتيريا *P. aeruginosa* [12].

التحري عن العزلات المنتجة للبايوفيلم Bioflim

تم زرع العزلات على وسط Trypton soy broth وحضنت في درجة حرارة 37م لمدة 48 ساعة وبعدها تم التخلص من المزرعة السائلة بحذر ثم استخدمت صبغه Crystal violet بتركيز 1% لمدة 30 دقيقة غسلت بالماء المقطر وتركت بدرجة حرارة الغرفة ثم قورنت النتائج مع السيطرة السالبة وملاحظة تكون طبقة البايوفيلم على سطح الانابيب الزجاجية بالعين المجردة [13].

الكشف عن انزيم الأميليز Amylase

زرعت المستعمرات على وسط الاكار المغذي الصلب الحاوي على 1 % نشا وبعد الحضن لمدة 24 ساعة بدرجه حرارة 37م تم ملاحظة مناطق التحلل حول المستعمرات دليل على انتاج انزيم الاميليز [4] .

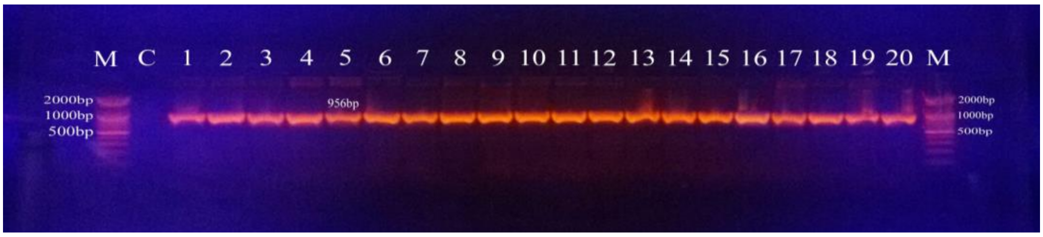
النتائج والمناقشه

بعد اجراء التحليلات اللازمة لتشخيص البكتريا [7] تم الحصول على (75) عزلة تعود الى بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من اصل 100 عزلة جمعت من حالات مرضية مختلفة يوضح جدول (1) عدد العزلات والنسب المئوية موزع حسب الحالات المرضية .

جدول (1): يبين عدد عزلات البكتريا ونسبها المئوية.

بكتريا *P. aeruginosa* المعزولة من حالات مرضية مختلفة	عدد العزلات	النسب المئوية (%)
التهابات الاذن الوسطى	28	37.33
التهابات الحروق	23	30.66
عينات الادرار	8	10.66
عينات الدم	6	8
التهابات الجروح	10	13.33
العدد الكلي	75	100

استخلص DNA من جميع العزلات المشخصة تم الكشف عن وجود جين *16s rDNA* والذي يعد من الجينات التي يعتمد عليها في تشخيص البكتريا *P. aeruginosa* استعمال تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وبينت نتائج الكشف عن الجين ان جميع عزلات *P. aeruginosa* حاملة لهذا الجين والذي يبلغ حجمة 956 زوج قاعدة وكما موضح في شكل (1).

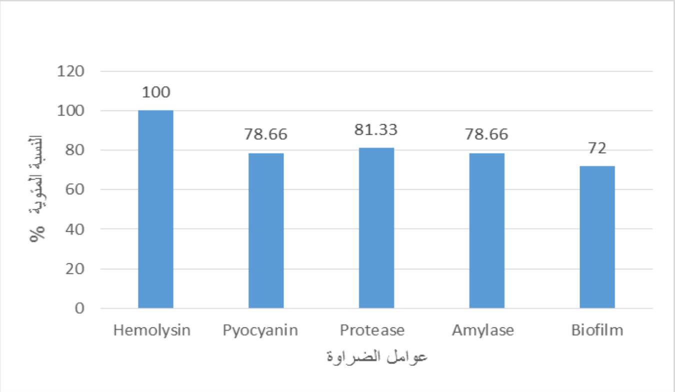


شكل (1): جين 16s rDNA في عزلات *P. aeruginosa* باستعمال الاكاروز بتركيز 1% الحاوي على 5µl من صبغة Eithidium bromide وباستعمال DNA ladder (M) (100bp-2000bp) وبفرق جهد 75 فولت لمدة ساعة.
M : Marker ؛ C : السيطرة ؛ 1 -20 العزلات .

اجري فحص الحساسية للمضادات الحيوية المختلفة واظهرت العزلات تباينا في مقاومتها للمضادات الحيوية حيث كانت مقاومة لمضادات Kanamycin بنسبة 100% فيما اظهرت مقاومة متباينه لكل من مضادات Ceftazidime 81.33%، Gentamicin 46.66% و Tobramycin 38.66% وقد تماثلت النسبة المئوية لمقاومة العزلات للمضادين Piperacillin و Ofloxacin وبنسبة 37.33 % لكل منهما، واظهرت العزلات مقاومة بنسبة 34.66% لكل من مضادي Ciprofloxacin و Norfloxacin ، واظهرت العزلات مقاومة ضعيفة للمضاد Aztreonam بنسبة 22.66% ولمضاد Imipenem بنسبة 17.33% شكل (2).

شكل (2): النسب المئوية لمقاومة البكتريا *P. aeruginosa* لانواع مختلفة من المضادات الحيوية

تم التحري عن بعض عوامل الضراوة التي تمتلكها البكتريا، واظهرت 75عزلة امتلاكها للانزيم الحال للدم Hemolysin بنسبة 100% واظهرت 61 عزلة 81.33% قابليتها على انتاج انزيم المحلل للبروتين Protease ، واظهرت اغلب العزلات 78.66% قابليتها لانتاج صبغة البايوسيانين Pyocyanin فضلا عن قدرتها على انتاج انزيم المحلل للنشا Amylase 59 عزلة 78.66% وجدت 54 عزلة 72% قابلية على انتاج البايوفلم Biofilm شكل (3) .



شكل (3): النسب المئوية لعوامل الضراوة التي تمتلكها بكتريا *P. aeruginosa*

تم الحصول على 75 عزلة تعود الى بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من اصل 100 عزلة، وكانت النتائج مقاربة مع دراسة سابقة [14] التي بينت ان اكثر عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* كانت معزولة من حالات التهابات الحروق 22 عزلة، وفي دراسة اخرى [15] لوحظ ان اكثر اصابات الحروق بنسبة 55 % كانت بسبب بكتريا *P. aeruginosa* تليها كل من اصابات الجروح التي بلغت 14.8% والتهابات الاذن الوسطى 32 %، تم الحصول على 23 من اصل 50 عزلة من حالات التهابات الجروح والحروق معا [1].

اجري فحص الحساسية للمضادات الحيوية المختلفة واظهرت العزلات تباينا في مقاومتها للمضادات الحيوية حيث كانت مقاومة لمضاد Kanamycin فيما اظهرت مقاومة متباينه لمضاد Ceftazidime واتفقت النتيجة مع [16] الذين بين ان 92% من عزلات *P. aeruginosa* مقاومة لمضاد Ceftazidime ويعود سبب مقاومة البكتريا لمضادات البيتالاكتام الى امتلاك البكتريا لانزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs والتي تكون جيناتها محموله اما الكرموسومات اوعلى البلازميدات في العديد من انواع البكتريا والذي يؤدي الى مقاومة متعدده للمضادات الحيوية المختلفة، واتفقت النتائج مع [17] الذي بينوا نسبة المقاومة لمضاد Aztreonam 29.3% ولمضاد Gentamicin 44% ولمضاد Imipenem 25.4% ويعود سبب مقاومة البكتريا لهذه المضادات الى امتلاك البكتريا لانزيمات carbapenemases و β-lactamases وانزيمات aminoglycoside-modifying enzyme، اضافة الى امتلاك البكتريا الى اليات اخرى للمقاومة منها قابلية البكتريا على تغييرنفاذية بروتينات الغشاء الخارجي وتغيير في موقع الهدف وقد يحصل تغيير في penicillin binding proteins (PBPs) وانزيمات topoisomerases، فضلا عن امتلاكها لانظمة الدفقefflux pumps مما يجعلها مقاومة لانواع مختلفة من المضادات منها مضادات الكينولينات والامينوكلايكوسايد [18].

عند التحري عن عوامل الضراوة التي تمتلكها البكتريا فقد اظهرت جميع العزلات امتلاكها للانزيم الحال للدم Hemolysin واتفقت النتيجة مع [14] التي بينت نسبة انتاج Hemolysin 100% ويعد انتاج بكتريا *P. aeruginosa* للهيمولاسين مهم في امراضية البكتريا حيث يعمل على تحطيم الخلايا ويسهل من عملية انتشار البكتريا ويعد من الانزيمات ذات السمية للخلايا حقيقية النواة، وبينت نسبة 81.33% من البكتريا قابليتها على انتاج انزيم المحلل للبروتين Protease ويعد هذا الانزيم من الانزيمات المهمة لضراوة البكتريا حيث يعمل على تحليل البروتينات قي الانسجة منها proteinaceous elements اضافة الى تحليل المستقبلات التي توجد على سطح الخلايا Neutrophils وكانت النتيجة مقاربة مع [19] الذين بينوا ان نسبة انتاج Protease من قبل بكتريا *P. aeruginosa* المعزولة من حالات سريرية مختلفة بنسبة 86%، وعند الكشف عن انتاج البايوسيانين اظهرت اغلب العزلات قابليتها على انتاج صبغة البايوسيانين Pyocyanin وكانت النتائج مقاربة مع [20] الذي بين نسبة انتاج البايوسيانين 82.5% من عزلات *P. aeruginosa* اضافة على قابليتها على انتاج صبغات Pyocyanin و Pyoverdine معا، وبينت [21] ان 80% من عزلات بكتريا *P. aeruginosa* قابليتها على انتاج صبغة Pyocyanin، وتعد Pyocyanin من عوامل الضراوة المهمة للبكتريا وتعمل بمثابة حامل لعنصر الحديد حيث تحصل على الحديد المعقد ويرتبط به بإحكام وتعمل عل نقل الحديد الذائب من البيئة الى الخلية عند حصول نقص بالحديد ويعد عنصر الحديد أساسيا في تشكيل Biofilm، وعند التحري على انزيم المحلل للنشا Amylase اظهرت النتائج نسبة 78.66% من بكتريا *P. aeruginosa* قدرتها على انتاج هذا الانزيم واتفقت النتائج مع دراسة سابقة [4] التي بينت ان افضل انتاج للانزيمات الخارج خلوية Exoenzyme لبكتريا *P. aeruginosa* كان لكل من انزيمات Caseinase و Amylase وتعد هذه الانزيمات من عوامل الضراوة المهمة لامراضية البكتريا حيث تعمل على تحليل النشا ومادة الكازئين، وعند التحري عن انتاج البكتريا Biofilm فقد اظهرت معظم البكتريا قابليتها على انتاج Biofilm واتفقت هذه النتائج مع [3] الذي بين ان 78% من العزلات قابليتها على انتاج Biofilm في حين بينت [14] ان 68.33% من عزلات *P. aeruginosa* المعزولة من حالات سريرية مختلفة قابليتها على انتاج Biofilm، وان امتلاك البكتريا قابلية على انتاج Biofilm يساعدها على الالتصاق بالخلايا المضيفة اضافة الى ذلك يزيد من قابلية البكتريا لمقاومة المضادات الحيوية المختلفة فضلاعن المقاومة المتعدده وفشل العلاج بها، وان زيادة امتلاك البكتريا لعوامل الضراوة يزيد من امراضية البكتريا فضلا عن زيادة قابليتها لمقاومة المضادات الحيوية المختلفة مما يجعل علاجها غاية في الصعوبة.

تم الكشف عن وجود جين *16s rDNA* في جميع عزلات *P. aeruginosa* وباستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وبينت نتائج الكشف عن هذا الجين ان جميع عزلات بكتريا *P. aeruginosa* حاملة لهذا الجين والذي يبلغ حجمه 956 زوج قاعدة، اتفقت هذه النتائج مع [6] الذي بين ان 100% من عزلات *P. aeruginosa* التي تم تشخيصها بالطرق الاعتيادية كانت حاملة للجين *16S rDNA* تؤكد كفاءة طريقة PCR للكشف عن جين *16S rDNA* في البكتريا وتعد هذه الطريقة من الطرق السريعة والسهلة والمفيدة والاكثر دقة والموثوق بها لتشخيص بكتريا *P. aeruginosa*. وهذا الجين يعد من الجينات المهمه حيث من خلاله يمكن تحديد العامل الوراثي للبكتريا والتي يمكن تمييز الجين الخاص

بالبكتريا *P. aeruginosa* عن الانواع الاخرى من البكتريا *Pseudomonas spp.* وذلك بالاعتماد على 16 S الرايبوسومي للحامض النووي DNA.

References

1. Al-Daraghi, W.A. and Abdullah, Z. H. (2013). Detection of Exotoxin A gene in *Pseudomonas aeruginosa* from Clinical and Environmental samples. Journal of Al-Nahrain University. 16(2): 167-172.
2. Wolska, K. and Szweda, P. (2009). Genetic Features of Clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains. Polish journal of Microbiology. 58(3): 255-260.
3. Senturk, S., Ulusoy, S., Bosgeimez- Tinaz, G. and Yagci, A. (2012). Quorum sensing and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during urinary tract infection. Journal Infection Dev. Ctries: 6 (6): 501-507.
4. Holban, A., Chifiriue, M. C., Cotar, A. I., Bleotu, C., Grumezescu, A. M., Banu, O. and Lazar, V. (2013). Virulence markers in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospital-acquired infections occurred in patients with underlying cardiovascular disease. Romanian Biotechnological Letters. 18(6): 8843-8854.
5. Nikbin, V.S., Aslani, M.M., Sharafi, Z., Hashemipour, M., Shahcheraghi, F. and Ebrahimipour, G. H. (2012). Molecular Identification and detection of virulence genes among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different infectious origins. Iranian Journal of Microbiology 4(3):118-123.
6. Spilker, T., Coenye, T., Vandamme, P. and 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.
7. Baron, E. J., Finegold, S. M. and Peterson, I. L. R. (2007). Bailey and Scott،s Diagnostic Microbiology. 9th ed. Mosby Company. Missouri.
8. Vandepitte, J., Verhaegen, J., Engbaek, K., Rohner, P., Piot, P. and Heuck, C. C. (2003). Basic laboratory procedures in clinical Bacteriology. 2nd ed. World Health Organization Geneva. PP. 109-120.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. CLSI Document M 100-S22. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
10. Senior, B.W. and Hughes, C. (1987). Production and properties of hemolysin from clinical isolates of *Proteus*. Journal of Medical Microbiology. 24:17–25.
11. Senior, B.W. (1999). Investigation of the types and characteristics of the proteolytic enzyme formed by diverse strains of *Proteus species*. Journal of Medical Microbiology. 48: 623 -628.
12. Brown, P.D. and Izunda, A. (2004). Antibiotics resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Jamaica. Rev Panam Salud Publica. 16 (2):125-130.
13. Christensen, G. D., Simpson, W. A., Bison, A. L and Beachy, H. (1982). Adherence of slime – producing strains of *Staphlococcus epidermidis* to smooth surfaces Infect. Immune. 37: 317 – 326.
14. Al-Musawi, D.K.M. (2014). Correlation of Quorum Sensing Genes with Some Virulence Factors in *Pseudomonas aeruginosa*. MSc. Thesis. Al- Mustansiriyah University. College of Science.
15. Saleh, R.H., Naher, H.S. and Al-Saadi., M. A. K. (2012). Molecular Investigation of Type III Secretion Toxins-Encoding Genes in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Medical Journal of Babylon. 9(4):857-866.
16. Feglo, P. and Opoku, S. (2014). AmpC beta-lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis* isolates at the Komfo Anoke Teaching Hospital, Kumasi, Ghana. Journal of Microbiology and Antimicrobials. 6(1):13-20.
17. Siqueira, V.L.D., Cardosa, R.F., Padua, R. A. F., Caleffi-Ferracioli, K. R., Helbel, C., Santos, A.C.B., Aoki, E. E. and Nakamura, C.V. (2013). High genetic diversity among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter spp*. Isolate in a public hospital in Brazil. Brazillin Journal of Pharmaceutical Sciences. 49(1):49-56.
18. Aboulmagd, E. and Alsultan, A.A. (2014). Synergic bactericidal activity of novel antibiotic combination against extreme drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. African Journal of Microbiology Research. 8(9):856-861.
19. Samaan, S.F., Al-Ani, S.R. and Abdullah, R.M. (2008). Study on Protease Produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical cases. Ibn AL-Haitham Journal for pure and Application Science. 21(3):24-36.
20. Finlayson, E.A. and Brown, P.D. (2011). Comparison of Antibiotic Resistance and Virulence Factors in Pigmented and Non-pigmented *Pseudomonas aeruginosa*. West Indian Medical Journal. 60 (1): 24-32.
21. Passat, D.N.F. (2006). The effect of aqueous and alcoholic extracts of *Withania somnifera* (L.). Dun. and *Urtica* urens (L.) in some virulence factors and plasmid DNA in local isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. M.Sc. thesis. University of Baghdad. College of Science.