P- ISSN 1991-8941 E-ISSN 2706-6703 مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة (JUAPS) Open Access
2017,11 (1) :20-29

التشخيص الوراثي للجينات *Opr I* و *Opr L* في بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من مصادر محلية مختلفة.

محمد ابراهيم نادر * جمال عبد الرحمن ابراهيم** وسام كريم السويداوي**

*جامعة بغداد – معهد الهندسة الوراثية

**جامعة الانبار – كلية التربية للعلوم الصرفة

معلومات البحث:

تاريخ التسليم: 2017/01/02
تاريخ القبول: 2017/5/11
تاريخ النشر: / /

DOI: 10.37652/juaps.2017.141449

الكلمات المفتاحية:

بكتريا *P.aeruginosa*,
جين *16SrDNA*,
جين *Opr I*,
جين *Opr L*.

الخلاصة:

تعد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من الممرضات الانتهازية القادرة على اصابة كل انسجة الجسم تقريبا نتيجة لامتلاكها لمجموعة كبيرة ومتنوعة من عوامل الضراوة والتي تسهم بشكل كبير في احداث الامراضية لدى المضيف. تم في الدراسة الحالية جمع 119 عينة من مصادر سريرية وبيئية مختلفة, للتحري عن انتشار بكتريا *P.aeruginosa* في هذه المصادر ودراسة بعض عوامل الضراوة التي تمتلكها هذه البكتريا. شخصت العزلات النامية بعد زرعها على الاوساط الزرعية المختلفة من خلال الصفات المظهرية والمجهرية والزرعية وتم تأكيد التشخيص باستخدام عدة API 20E, فضلا عن التشخيص الجزيئي كتشخيص نهائي للعزلات التي اعطت نتيجة ايجابية على انها بكتريا *P.aeruginosa* خلال الاختبارات السابقة وتم ذلك اعتمادا على جين التشخيص *16SrDNA* ذي التتابع الخاص ببكتريا *P.aeruginosa*. اظهرت نتائج التشخيص ان 61 عزلة اي بنسبة (51%) تعود للنوع *P.aeruginosa* من مجموع العينات السريرية والبيئية توزعت بين 15 عزلة (24.6%) من اخماج الحروق, 13 عزلة (21.4%)من اخماج الجروح, 10 عزلات (16.3%) من اخماج الاذن الوسطى, 5 عزلات (8.3%) من التليف الكيسي, 4 عزلات (6.5%) من اخماج المجاري البولية, 6 عزلات (9.8%) من التربة, 4 عزلات (6.5%) من الماء, 4 عزلات (6.5%) من صالات العمليات.بينت نتائج التحري عن بعض عوامل الضراوة بصورة مظهرية بان 58 عزلة بنسبة (95%) كانت منتجة لأنزيم الهيمولايسين من النوع β– hemolysis, في حين كانت 57 عزلة بنسبة (93.44%) من العزلات منتجة للأنزيم البروتيز الحال للبروتين وبدرجات متفاوتة, وكانت نسبة العزلات المنتجة لصبغة البايوسيانين 44(72.13%) من مجموع العزلات المدروسة.تم التحري عن نسبة انتشار الجينات المشفرة للبروتينات الدهنية *Opr I*, *Opr L*, باستخدام تقنية (PCR) وبينت النتائج وجود الجين *Opr I* بنسبة 100%, اما الجين *Opr L* فكانت نسبة وجودة 59 (96.72%) ضمن الهيكل الوراثي لعزلات بكتريا *P.aeruginosa* قيد الدراسة, ونتيجة لوجودها العالي ضمن اغلب مصادر العزلات المدروسة فبذلك يمكن اعتبار هذه الجينات البديل الناجح والسريع لتشخيص بكتريا *P.aeruginosa* بطرق جزيئية اعتمادا على تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR).

P- ISSN 1991-8941 E-ISSN 2706-6703 مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة (JUAPS) Open Access
2017,11 (1) :20-29

المقدمة:

تعد بكتريا الزوائف الزنجارية من الممرضات الانتهازية الشائعة, وهي بكتريا عصوية الشكل سالبة لملون كرام, تعود لعائلة Pseudomonadaceae, وهي مسؤولة عن 8-16% من عدوى المستشفيات **[1]** . تتواجد *P.aeruginosa* في البيئات الرطبة والدافئة على وجه الخصوص, ويمكن ان تكون معزولة من مختلف المصادر الحية بما في ذلك النباتات والحيوانات والبشر, ومصادر التربة , الماء, والغذاء ويعود سبب انتشارها الواسع في مختلف البيئات وقدرتها على احداث الاصابات الشديدة الى قدرتها على البقاء عند الحد الادنى من الاحتياجات الغذائية ومقاومتها لمختلف الظروف البيئية والمضادات الحيوية وذلك لما تتمتع به من خصائص ايضية وانزيمية متنوعة **[2]**. وهذه البكتريا نادرا ما تسبب الاصابة عند الاشخاص الاصحاء حيث تشكل خطرا كبيرا على المرضى الراقدين في المستشفيات لأنها تعتبر احد اهم الانواع البكتيرية المسببة لما يعرف بالإصابات المكتسبة في المستشفيات **[4,3]** وقد اشارت احصائيات مركز السيطرة على الامراض العالمي والوقاية منها Centers for Disease Control (CDC) الى ان بكتريا *P.aeruginosa* هي رابع الانواع البكتيرية الاكثر انتشارا والمعزولة من مختلف الامراض المستشفوية المكتسبة **[5]**. تقوم بكتريا الزوائف الزنجارية بكسر دفاعات المضيف وتسبب بذلك العديد من الامراض متمثلة باخماج الجهاز التنفسي واخماج الحروق والجروح واخماج العين واخماج الجلد والمجاري البولية والاذن الوسطى وتجرثم الدم واخماج العظام والمفاصل واخماج الجهاز الهضمي **[6]** فضلا عن الاصابات الجهازية الاخرى لاسيما عند الاشخاص الذين يعانون من حروق شديده والسرطان والايدز اذ ان ضعف الجهاز المناعي يؤدي الى استفحال الاصابة وبالتالي موت المريض**[7]** .

* Corresponding author at: Collage of Education- University of Anbar

E-mail address:

تمتلك بكتريا *P.aeruginosa* مجموعة كبيرة ومتنوعة من عوامل الضراوة والتي تفرز منها خارج الخلية والتي قد تسهم في تحقيق الامراضية لهذه البكتريا وقد تمثلت هذه العوامل بالذيفان الخارجي Exotoxin A (ETA), بروتينات الغلاف الخارجي Opr I و Opr L, انزيم الايلاستيز Elastase **[8]**, وانزيم Hemolysin, الغشاء الحيوي, والانزيم الحال للبروتين**[9]** , ولكل منها دور في حماية هذه البكتريا وتعزيز قدرتها على الانتشار والبقاء, وان امتلاك البكتريا لهذه العوامل وقدرتها العالية على انتاجها يشير بدورة الى التكيف العالي لهذه السلالات مع الظروف الخاصة بكل من موقع الإصابة او الانتشار**[10]**, ويتم تنظيم عمل هذه العوامل بواسطة اشارات تواصل بين خلية بكتيرية واخرى تتم من خلال نظام Quorum sensing (QS) حيث تعمل جميع الخلايا البكتيرية ككتلة واحدة في مقاومة الظروف المختلفة التي تهدد بقائها**[11]**, وقد يكون التنظيم عن طريق اشارات جزيئية يصدرها المضيف متمثلة بالهرمونات**[12]** , فضلا عن ذلك فان مدى اصابة انسجة المضيف ببكتريا *P.aeruginosa* تكون مرتبطة بعدة عوامل منها القابلية المناعية لذلك المضيف, اعداد الخلايا البكتيرية, والقابلية الانتاجية لعوامل الضراوة الخارج خلوية **[13]**.

عادة ما تستخدم معظم المختبرات الاساليب التقليدية كالزرع والطرق البايوكيميائية في التشخيص المختبري للإصابات البكتيرية المختلفة, الا ان التداخل الحاصل بين الانواع البكتيرية وتقاربها مظهريا جعل هذه الاساليب غير مجدية في التشخيص. من ناحية اخرى, ان هذه الطرق تستغرق وقتا طويلا للتأكيد قد يصل لعدة ايام, وهذه العملية مشكلة بحد ذاتها نتيجة لإمكانية تفاقم حالة المريض خلال فترة التشخيص, وبذلك ستنتج مشكلة في السيطرة على الاصابة**[14]**, وعلاه على ذلك فان الحصول على نتائج غير دقيقة خلال التشخيص التقليدي قد يؤدي بدورة الى تدهور حالة المريض الذي قد ينتهي بالموت لاسيما المرضى المصابين بالتليف الكيسي نتيجة للاستخدام غير الصحيح لعوامل السيطرة على الاصابة **[15]**لذلك فان خطورة الامراض التي تسببها الانواع الميكروبية المختلفة وعدم توفر العلاج المناسب للقضاء على هذه الامراض كان دافعا لتركيز الابحاث في العالم حول تحسين كفاءة التشخيص, وتقليل الوقت والجهد, لذلك فقد استخدم مؤخرا تقنيات حديثة في التشخيص, تمثلت بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وتعد من افضل الوسائل التشخيصية لما تمتاز به من الخصوصية والدقة والسرعة العالية للتحري عن المسببات المرضية, في مختلف العينات السريرية والبيئية, ولاسيما عند حدوث الاوبئة من

خلال الكشف عن الجينات المشفرة لعوامل الضراوة, وامكانية اعتمادها كمؤشرات جزيئية في الدراسات التشخيصية, والتي تعجز طرائق التشخيص المختبري التقليدية التحري عنها خاصة عند التعامل مع اعداد كبيرة من النماذج **[16]** .

في هذه الدراسة كان الهدف هو التحري عن انتشار الجينات المشفرة للبروتينات الدهنية *Opr I* و *Opr L* في بكتريا *P.aeruginosa* ضمن الهيكل الوراثي لمصادر العزلات البيئية والسريرية المتنوعة, وتقييمها كبديل ناجح وسريع لتشخيص بكتريا *P.aeruginosa* ضمن المصادر المختلفة.

المواد وطرائق العمل:

عزل وتشخيص بكتريا *P.aeruginosa*

تم جمع 119 عينة من مصادر سريرية وبيئية مختلفة خلال الفترة من 15 كانون الاول لسنة 2015 ولغاية 28 شباط لسنة 2016 وكما موضح في الجدول (1).

جدول(1): نوع ومصدر والمكان الذي استحصلت منه العينات وعددها في الدراسة الحالية.

ت	نوع العينة	المصدر	المكان الذي استحصلت منه	العدد
1	سريرية	خمج الحروق	مستشفى الحروق/ مدينة الطب	33
2	سريرية	خمج الجروح	مستشفى اليرموك التعليمي	22
3	سريرية	خمج الاذن الوسطى	المختبرات التعليمية / مدينة الطب	17
4	سريرية	التليف الكيسي	طلبة دراسات / معهد الهندسة الوراثية	7
5	سريرية	خمج المجاري البولية	مستشفى الكرامة التعليمي	11
العدد الكلي للعينات السريرية			**90 عينة**	
ت	نوع العينة	المصدر	المكان الذي استحصلت منه	العدد
6	بيئية	التربة	حدائق كلية الزراعة	10
7	بيئية	الماء	نهر دجلة	10
8	بيئية	صالات العمليات	مستشفى اليرموك التعليمي	9
العدد الكلي للعينات لبيئية			**29 عينة**	

تشخيص العزلات:

شخصت العزلات البكتيرية من خلال ملاحظة قدرتها على النمو على العديد من الاوساط الزرعية التشخيصية والمتمثلة بوسط اكار المكونكي MacConkey agar, وسط اكار السيدوموناس Pseudomonas agar, وسط اكار السترميد Cetrimide agar و وسط اكار الكرومايجين اورينتيشن CHROM agar orientation وتم ملاحظة التغيرات التي احدثتها المستعمرات النامية على تلك الاوساط ودراسة صفاتها المظهرية من حيث شكل, حجم, ولون المستعمرات النامية **[17]**, فضلا عن الاختبارات البايوكيميائية والمتمثلة باختبار Oxidase و Catalase واختبارات IMVC وتم تأكيد التشخيص باستعمال نظام API- 20E للتأكيد النهائي لعزلات بكتريا *P.aeruginosa* وحسب تعليمات الشركة المصنعة.

استخلاص الدنا البكتيري:

استعملت عدة استخلاص DNA الجينومي Genomic DNA mini kit المجهزة من قبل شركة Geneaid لاستخلاص الدنا للعزلات البكتيرية قيد الدراسة وحسب النشرة المرفقة مع عدة الاستخلاص.

تحضير البادئ:

حضرت محاليل البوادىء المبينة في الجدول (2) وبشكل منفصل بتركيز 10 بيكو مول/ مايكروليتر وذلك بأخذ 10 مايكروليتر من المحلول الخزين لكل بادئ واضافته الى 90 مايكروليتر من الماء المقطر اللايوني ومزج جيدا وحفظ في الثلج لحين الاستعمال في حين حفظت المحاليل الخزنية Stock للبوادىء في درجة حرارة −20 م مع مراعاة مزج المحلول بعد اخراجه من الثلج باستعمال المازج Vortex لمجانسته قبل الاستعمال**[18]**.

جدول (2): البوادىء المستخدمة في هذه الدراسة.

Primer Name	Orientation	Primer sequences (5́-3́)	AT (°C)	Product size(pb)
16SrDNA	F	5́-GGGGGATCTTCGGACCTCA-3́	58	956 bp
	R	5́-TCCTTAGAGTGCCCACCCG-3́	58	
Opr I	F	ATGAACAACGTTCTGAA 5́–ATTCTCTGCT-3´	57	249 bp
	R	CTTGCGGCTGGCTTTTTC 5́-CAG-3´	57	
Opr L	F	ATGGAAATGCTGAAATT 5́-CGGC-3´	57	504 bp
	R	CTTCTTCAGCTCGACGC 5́ –GACG -3´	57	

التشخيص الجزيئي لبكتريا *P.aeruginosa* بوساطة الجين التشخيصي *16SrDNA* باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR):

حظر خليط PCR من *GO Taq* Green Master Mix والمجهز من قبل شركة Promega USA وبحجم 12.5 مايكروليتر, 1 مايكروليتر من F-Primer, 1 مايكروليتر من R-Primer, 2 مايكروليتر من الدنا القالب template DNA و8.5 مايكروليتر من الماء المقطر اللأيوني المعقم والمجهز من قبل شركة Promega (USA) حيث اصبح الحجم النهائي لمزيج التفاعل 25 مايكروليتر, بعد ذلك مزجت محتويات انابيب PCR جيدا باستعمال المازج ثم وضعت في جهاز PCR وحسب البرنامج الخاص بجين *16SrDNA* الذي ورد في **[19]** مع اجراء بعض التحويرات على برنامج PCR للوصول الى البرنامج الامثل Optimization program للحصول على المنتج وكما موضح في جدول (3).

جدول (3): برنامج PCR الخاص بتحديد جين *16SrDNA* لبكتريا *P. aeruginosa*.

Step	Temperature (˚C)	Time (second)	No. of cycle
Initial	95	120	1
Denaturation	94	20	35
Annealing	58	20	
Extension	72	40	
Final	72	420	1
Hold	4	180	-

وبعد ذلك نقل 5 مايكروليتر من ناتج تضاعف الجين للترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز المحضر بتركيز 1.5%.

الكشف الجيني عن بعض عوامل الضراوة المسؤولة عن المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية باستعمال تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR): حظر خليط PCR من *GO Taq* Green Master Mix والمجهز من قبل شركة Promega USA للجينات المشفرة لبروتينات الغشاء الخارجي *Opr I* و*Opr L* بنفس الطريقة التي حضر منها خيط التفاعل للجين *16SrDNA* وبحسب البرنامج المذكور لكلا الجينين في الجدول (4).

جدول (4): برنامج PCR المستخدم في تضخيم الجينات (*Opr I*, *Opr L*) المتخصصة والمسؤولة عن المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية في بكتريا *P. aeruginosa*:

Primer	1 cycle	30 cycle		1cycle		H.T
	Initial denaturation	denaturation	annealing	Extension	Final Extension	
	Time=180sec	Time=40 sec	Time=40 sec	Time=50 sec	Time= 300sec	180 sec
Opr I	Temp=94˚C	Temp=94˚C	Temp=57˚C	Temp=72˚C	Temp=72˚C	4 ˚C
Opr L	Temp=94˚C	Temp=94˚C	Temp=57˚C	Temp=72˚C	Temp=72˚C	

بعد عملية تضخيم الجينات بوساطة تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR, تم اخذ 5 مايكروليتر من ناتج التفاعل بوساطة ماصة دقيقة وحمل الناتج الخاص بكل جين في حفر الترحيل الكهربائي مع الواسمات القياسية للدنا DNA ladder 100bp وبعد انتهاء تحميل العينات في الهلام الذي تكون من أكاروز بتركيز 1.5غم الذائب بحجم 100 مللتر من محلول TBE Buffer 1X, رحلت العينات كهربائيا بفرق جهد مقداره 70V لمدة 90 دقيقة وبعد الانتهاء من عملية الترحيل نقل القالب لفحص الهلام بتعريضه الى مصدر للأشعة فوق البنفسجية عند طول موجي (340) نانوميتر لغرض تحديد حجوم الجينات المدروسة اعتمادا على الواسمات القياسية **[20]**.

النتائج والمناقشة:

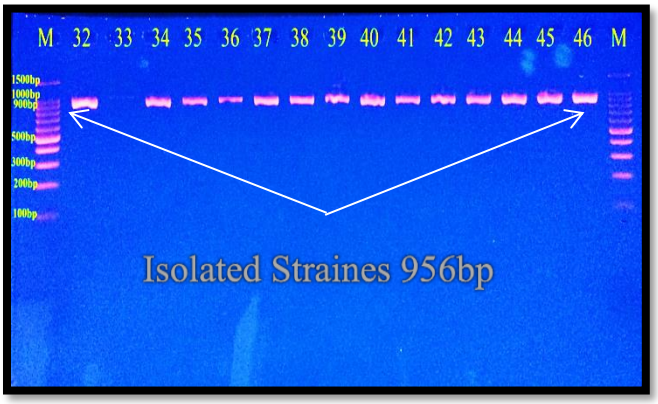
بعد اجراء الخطوات اللازمة لتشخيص بكتريا *P.aeruginosa* من العينات الدراسية المستحصل عليها والمتضمنة كل من الاختبارات المزرعية والكيميائية والجزيئية اللازمة للتشخيص, تم الحصول على 61

عزلة تعود لبكتريا *P.aeruginosa* من اصل 119 عينة تم الحصول عليها من مصادر سريرية وبيئية مختلفة اذ يوضح الجدول (5) عدد العزلات والنسب المئوية موزعة حسب مصادر العزل.

جدول (5): اعدادا ونسب عزلات بكتريا *P.aeruginosa* موزعة حسب مصادر العزل.

ت	مصادر العزل	العدد الكلي للعينات	عدد عزلات بكتريا *P.aeruginosa*	النسبة المئوية %	
				نوعي[1]	اجمالي[1]
1	الحروق Burn	33	15	24.6	12.6
2	الجروح Wound	22	13	21.4	10.9
3	التهابات الاذن الوسطى	17	10	16.3	8.4
4	التليف الكيسي	7	5	8.3	4.2
5	التهاب المجاري البولية UTI	11	4	6.5	3.3
6	التربة Soil	10	6	9.8	5.0
7	الماء Water	10	4	6.5	3.3
8	صالات العمليات	9	4	6.5	3.3
	العدد الكلي	119	61	100	%51

تمت عملية استخلاص الدنا البكتيري من جميع العزلات المشخصة بوساطة الاختبارات المزرعية والبايوكيميائية, وتم الكشف عن وجود الجين *16SrDNA* ضمن الهيكل الوراثي لتلك العزلات والذي يعد من الجينات التي يعتمد عليها في التشخيص الدقيق لبكتريا *P.aeruginosa* بوساطة تقنية PCR, اذ بينت نتائج الكشف عن الجين ان جميع العزلات تمتلك هذا الجين ضمن هيكلها الوراثي وبحجم تضاعفي 956 زوج قاعدي عند مقارنته بالواسمات القياسية للدنا المعلومة الوزن الجزيئي وكما موضح في شكل(1).

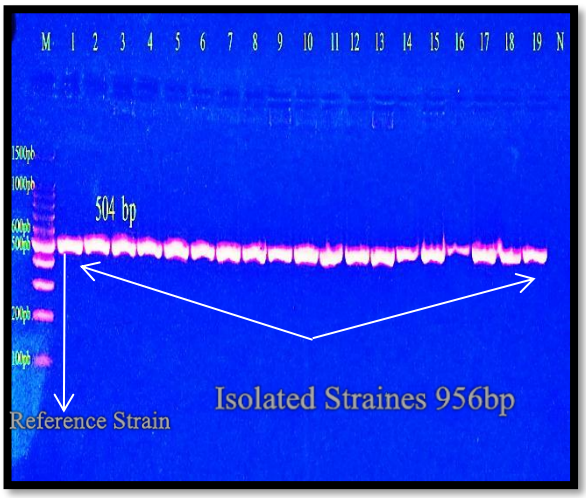


شكل (1): الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لعزلات بكتريا *P.aeruginosa* باستعمال البادئ النوعي للجين *16SrDNA* (956 زوج قاعدي) على هلام الاكاروز بتركيز 1.5% وفرق جهد 70 فولت / لمدة 90 دقيقة.

المسار M يمثل الدليل الحجمي 100 زوج قاعدي, المسارات (32- 46) ناتج التضخيم للجين *16SrDNA* لعزلات بكتريا *P.aeruginosa* المختلفة.

بينت نتائج التحري عن بعض عوامل الضراوة بصورة مظهرية بان 58 عزلة بنسبة (95%) كانت منتجة لأنزيم الهيمولايسين من النوع – β hemolysis, في حين كانت 57 عزلة بنسبة (93.44%) من العزلات منتجة للأنزيم البروتيز الحال للبروتين وبدرجات متفاوتة, وكانت نسبة العزلات المنتجة لصبغة البايوسيانين 44(72.13%) من مجموع العزلات المدروسة.

تم التحري عن وجود جينات الضراوة المشفرة للبروتينات الدهنية التي تتخلل الغشاء الخارجي في عزلات بكتريا *P.aeruginosa* وهي *Opr I*, *Opr L*, ضمن الهيكل الوراثي للبكتريا والتي يعد وجودها مكسبا لهذه البكتريا والذي يعزز في زيادة مقاومتها للظروف البيئية والمضادات الحيوية, وبينت النتائج ان جميع العزلات تمتلك الجين *Opr I* وبنسبة 100%, اما الجين *Opr L* فكانت نسبة وجودة 59 (96.72%) ضمن الهيكل الوراثي للعزلات المدروسة كما موضح في الشكل (2) و(3).

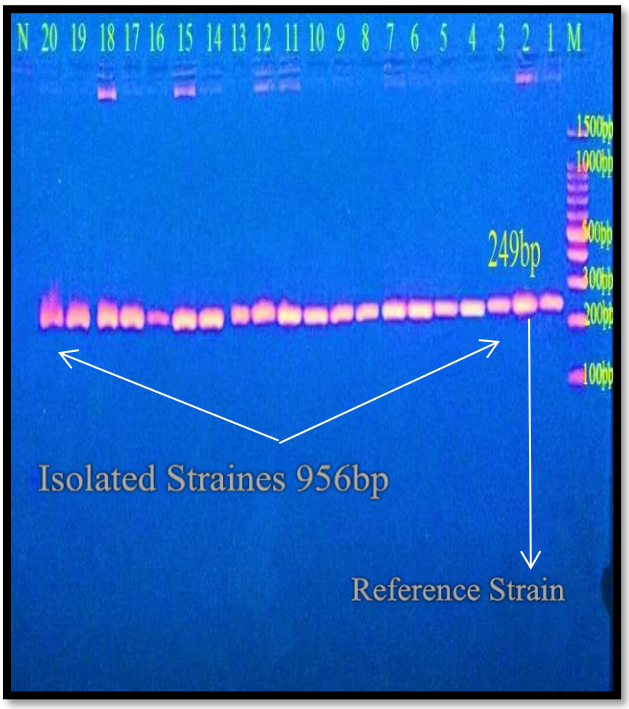


شكل (2): الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لعزلات بكتريا *P.aeruginosa* باستعمال البادئ النوعي للجين *Opr L* (504 زوج قاعدي) على هلام الاكاروز بتركيز 1.5% وفرق جهد 70 فولت / لمدة 90 دقيقة.

المسار M يمثل الدليل الحجمي 100 زوج قاعدي, المسار N النتيجة السالبة Negative control .

المسار (1) يمثل ناتج التضخيم للجين *Opr L* للعزلة القياسية ATCC 27853.

المسارات (2-19) تمثل ناتج تضخيم الجين *Opr L* لعزلات بكتريا *P.aeruginosa* المختلفة.

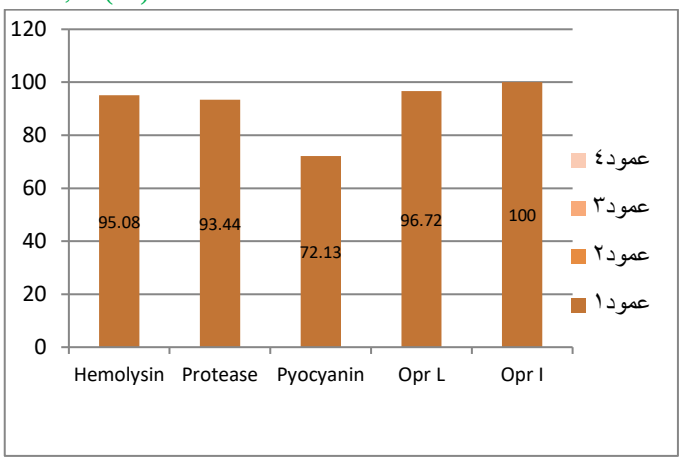


شكل (3): الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لعزلات بكتريا *P.aeruginosa* باستعمال البادئ النوعي للجين *Opr I* (249 زوج قاعدي) على هلام الاكاروز بتركيز 1.5% وفرق جهد 70 فولت / لمدة 90 دقيقة.

المسار M يمثل الدليل الحجمي 100 زوج قاعدي, المسار N النتيجة السالبة Negative control.

المسار (1) يمثل ناتج التضخيم للجين *Opr I* للعزلة القياسية ATCC 27853.

المسارات (2- 20) تمثل ناتج تضخيم الجين *Opr I* لعزلات بكتريا *P.aeruginosa* المختلفة.



شكل (4): النسب المئوية لعوامل الضراوة التي تمتلكها عزلات بكتريا *P.aeruginosa*.

تعد بكتريا *P.aeruginosa* من الممرضات الانتهازية والمسؤولة عن عدد كبير من الامراض المكتسبة داخل المستشفيات وقد عزلت من عدد كبير من الحالات المرضية المختلفة لاسيما الحروق, والتهابات ما بعد العمليات الجراحية**[21]** . بينت نتائج الدراسة الحالية ان اعلى نسبة للعزلات قيد الدراسة كانت من الحروق اذ بلغت نسبتها 61/15 (24.6%) تلتها الجروح بنسبة 61/13 (21.4%), وقد اتفقت نتيجة الدراسة مع النتيجة التي حصل عليها **[22]** اذ وجدوا ان بكتريا *P.aeruginosa* تعد من اكثر الانواع البكتيرية المسببة لإصابات الحروق والجروح والاكثر ترددا من بين الاصابات الاخرى في المستشفيات التي تسببها هذه البكتريا. اما نسبة الاصابة باخماج الاذن الوسطى فقد حلت بعد اخماج الجروح وبنسبة 61/10 (16.3%), وهذه النتيجة اتفقت مع ما حصلوا عليه **[23]** اذ كانت نسبة العزل في دراستهم (12%) من حالات خمج الاذن الوسطى, في حين كانت نسبة الاصابة باخماج المجاري البولية 61/4 (6.5%) وهذه النتيجة اتفقت مع النتيجة التي حصل عليها **[24]** حيث كانت نسبة العزلات المستحصل عليها في دراسته من اخماج المجاري البولية (5.7%), ويعود سبب انخفاض نسبة هذه العزلات الى قلة عدد العينات المستحصل عليها من المرضى الخاضعين لعملية القسطرة او الى الممارسات الصحيحة في التعقيم من قبل المستشفيات.

بينت نتائج التشخيص الجزيئي لبكتريا *P.aeruginosa* باستخدام الجين *16SrDNA* ان جميع العزلات تمتلك هذا الجين ضمن هيكلها الوراثي وبنسبة 100%, اتفقت النتيجة المستحصل عليها مع ما ذكره **[25]** خلال دراستهم في تشخيص بكتريا *P.aeruginosa* عن طريق

جين *16SrDNA*, حيث وجدوا ان التشخيص باستعمال جين *16SrDNA* يعد من التشخيصات الدقيقة لبكتريا *P.aeruginosa* وللأنواع الاخرى وذلك لأن له تسلسل ثابت لكل نوع من الانواع البكتيرية ونظرا لثبات تسلسلات هذا الجين لعب دورا عالي الاهمية في التصنيف للأحياء البدائية والتشخيص الجزيئي. وبذلك, يعد جين *16SrDNA* البديل الناجح في تشخيص الاحياء المجهرية الدقيقة كبديل سريع ورخيص مقارنة بالأساليب المظهرية التي استخدمت سابقا بشكل واسع على النطاق المختبري**[26]**.

عند التحري عن بعض عوامل الضراوة التي تمتلكها بكتريا *P.aeruginosa* اظهرت النتائج ان 58 عزلة بنسبة (95.08%) من عزلات بكتريا *P.aeruginosa* المعزولة من مصادر سريرية وبيئية تمتلك القدرة على انتاج انزيم الهيمولايسين وكان التحلل فيها من النوع الكلي β- hemolysis, وتتفق هذه النتيجة مع ما توصلوا اليه **[27]** حيث وجدوا ان(96%) من عزلات *P.aeruginosa* منتجة لإنزيم الهيمولايسين ومن نوع β- hemolysis. ان سبب انتاج بكتريا *P.aeruginosa* لإنزيم الهيمولايسين هو لتحليل الخلايا والحصول على الحديد الذي يعزز قدرة الخلايا على البقاء والتكاثر داخل جسم العائل حيث تنتج نوعين من الانزيمات الحالة PLC-H و PLC-N التي تعمل بشكل متسلسل على تحليل خلايا العائل**[28]**, وان61/57 عزلة وبنسبة 93.44% من بكتريا *P.aeruginosa* منتجة لإنزيم البروتيز ولكن بدرجات متفاوتة بحسب قطر التحلل المتكون حول المستعمرات, اتفقت هذه النتيجة مع ما حصلوا عليه **[29]** حيث وجدوا ان غالبية العزلات المستحصل عليها من مصادر سريرية مختلفة كانت منتجة لإنزيم البروتيز وبنسبة (93%), ويعتبر انزيم البروتيز احد عوامل الضراوة المهمة لبكتريا *P.aeruginosa* والذي يفرز الى خارج الخلية البكتيرية اذ يلعب دورا كبيرا في غزو وتوطين وانتشار الاصابة البكتيرية وذلك من خلال اتلاف انسجة المضيف, وتحطيم بروتينات البلازما المختلفة وعوامل التخثر **[30]** فضلا عن اهميتها في نمو الخلايا البكتيرية والتمايز **[31]**. كذلك ابدت غالبية العزلات قابليتها على انتاج صبغة البايوسيانين Pyocyanin وان كانت بدرجات متفاوتة عند تنميتها على وسط السترمايد او المولر هنتون اكار حيث بلغ عدد العزلات المنتجة للصبغة 44 عزلة وبنسبة (72.13%), وهذه النتيجة تتفق مع النتيجة التي حصل عليها **[32]** حيث وجد ان اغلب العزلات السريرية والبيئية لبكتريا *P.aeruginosa* منتجة لصبغة البايوسيانين, واشار الى ان هذه العزلات سواء كانت بيئية او سريرية لا تختلف في انتاجها لهذه الصبغة انما الاختلاف يتحتم في الظروف التي تتعرض لها تلك العزلات وبذلك تكسبها او لا تكسبها القدرة على انتاج صبغة البايوسيانين.

وعند التحري عن الجينات *Opr I* و *Opr L* المشفرة لبروتينات الغشاء الخارجي, بينت النتائج ان جميع العزلات الدراسية تمتلك الجين *Opr I* ضمن هيكلها الوراثي وبنسبة 100%, جاءت هذه النتيجة موافقة لما حصل عليه **[33]** خلال دراسته على بكتريا *P.aeruginosa* المعزولة من الجروح والحروق حيث وجد ان جميع العزلات كانت تمتلك جين *Opr I* في هيكلها الوراثي وبنسبة (100%), وان تتابعات هذا الجين تكون محفوظة بدرجة كبيرة ضمن الهيكل الوراثي لبكتريا *P.aeruginosa* ولأغلب انواع جنس الزوائف المتألقة Fluorescent Pseudomonadsالذي تنتمي اليه هذه البكتريا **[34]** لذلك استخدم كمؤشر مهم في التصنيف الجزيئي والنشوء والتطور لمجموعة الزوائف rRNA group I **[35]**, فيما بينت نتائج الكشف عن الجين *Opr L* الى ان 61/59 عزلة بنسبة (96.72%) تمتلك هذا الجين ضمن هيكلها الوراثي, اتفقت هذه النتيجة مع ما حصلوا عليه **[8]** خلال دراستهم التي قاموا بها لتحديد وجود الجين *Opr L* في بكتريا *P.aeruginosa* المعزولة من مصادر سريرية مختلفة حيث وجدوا ان جميع العزلات التي بلغ عددها 30 عزلة كانت تمتلك هذا الجين وبنسبة (100%). ان سبب وجوده الكبير في جميع العزلات السريرية واغلب العزلات البيئية وذلك لكونه يشفر للبروتينات الدهنية Lipoprotein التي تعتبر من مكونات الاغشية الخارجية لبكتريا *P.aeruginosa* لاسيما الناضجة منها, وفي تحقيق الامراضية للعديد من الاصابات البكتيرية لكونه احد عوامل الضراوة, فضلا عن كونه جزء من انظمة الدفق Efflux pump للمضادات الحيوية والسموم المؤثرة على الخلايا البكتيرية اذ تؤثر بصورة مباشرة على نفاذية الاغشية الخلوية وبذلك تمنع المضادات والسموم من التأثير على الخلية البكتيرية وهذا يؤدي بدورة الى زيادة المقاومة **[35]**.

المصادر:

1. Wargo, M. J. ; Gross, M. J.; Rajamani, S.; Allard, J. L. and Lundblad, L. K. A. (2011). Hemolytic Phospholipase C Inhibition Protects Lung Function

12. Holban, A.M. ; Chifiriue, M.C. and Lazar V. (2013). Host cells response in *Pseudomonas aeruginosa* infections - role of quorum sensing molecules. *African Journal of Microbiology Research*. 7(20), pp. 2140-2149.
13. Zhang, E.M. ; Butterworth, M.B. ; Heidrich, L. ; Myerburg, M.M. and Thibodeau, P. H. (2012). Activation of the epithelial sodium channel (ENAC) by the alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.*, 287(39), 32556, 32565.
14. Kidd, T.J. ; Ramsay, K.A. ; Hu, H. ;Bye, P.T. ; Elkins, M.R., Grimwood, K., et al. Low rates of Pseudomonas aeruginosa misidentification in isolates from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol. 2009;47(5):1503–9. doi: 10.1128/JCM.00014-09. [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref].
15. da Silva Filho, L.V.; Tateno, A.F.; Martins, K.M.; Azzuz Chernishev, A.C.; Garcia Dde, O. Haug, M. *et al*. (2007) The combination of PCR and serology increases the diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* colonization/ infection in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*.42(10): 44-938
16. Taee, S.R. ; Khansarinejad, B. ; Abtahi, H. ; Najafimosleh, M. and Ghaznavi-Rad, E. (2014) . Detection of *alg D , opr L and exo A* genes by new specific primers as an efficient , rapid and accurate procedure for direct diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* strains in clinical samples . *Jundishapur J. Microbiol* . 7(10): 1-10 .
17. Baron, E. J. ; Finegold, S. M. and Peterson, I. L. R. (2007) .Bailey and Scotts Diagnostic Microbiology. 9th ed. Mosby Company. Missouri.
18. Sonbol, F. I; Khalil, M. A. E.; Mohamed, A.B. and Ali, S.S. (2015). Correlation between antibiotic resistance and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Turkish J. of Med. Sci. 45: 568-577.
19. 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. J. Clin. Microbiol . 42 (5): 2074-2079.

during *Pseudomonas aeruginosa* Infection . *Respir Crit Care* Med , 184: 345-354.

2. Lister, P.D. ; Wolter, D.J. and Hanson, N.D. (2009) . Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* : clinical impact and complexregulation of chromosomally encoded resistance mechanisms . *Clinical Microbiology Reviews* . 22(4): 582-610 .
3. Hyeon**,** J.C. ; Kim, M.H. and Cho, M.S.(2013). Improved PCR for identification of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:3643–3651.
4. Vianelli, N.; Giannini, M.B and Quartic, C.(2006). Resolution of *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a haematology unit with the use of disposable sterile water filter. Haematol, J; 91(7):983-985.
5. Sivaraj, S.; Murugesan, P.; Muthuvelu, S. Purusothaman, S. and Silambarasan A.(2012). comparative study of pseudomonas aeruginosa isolate recovered from clinical and environmental samples against antibiotics. Int J Pharm Sci . 4(3):103-107.
6. Gale**,** T. (2012). Pseudomonas infection. Book rage. Inc.
7. Wijesinghe, L. P. and Weerasinghe, T. K. (2010). A Study on the Bactericidal Efficiency of Selecte Chemical Disinfectants and Antisepticsd . *OUSL Journal* , 6:44-58.
8. Khattab, M. A. ; Nour, M. S. and Elsheshtawy, N. M.(2015). Genetic Identification of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Genes among Different Isolates . *J Microb Biochem Technol*. 7(5) : 274-277.
9. Jimenez, P.N. ; Koch, G. ; Thompson, J.A. ; Xavier, K.B. ; Cool, R.H. and Quax, W.J. (2012) . The multiple singaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa* . *J.ASM*. 11: 46-65 .
10. Lanotte, P. h.; Watt, S.; Mereghetti, L.; Dartiguelongue, N. ; Rastegar-Lari, A. ; Goudeau, A. and Quentin, R. (2004). Genetic features of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients compared with those of isolates from other origins. *Journal of Medical Microbiology*. 53: 73–81.
11. Van-Delden, C. and Iglewski, B.H. (1998). Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis* .4: 551-560.

burn infection in Hilla city. Research in Pharmacy. 3(2):26 -32 .

29. Onal, S.; Aridogan, B. C.; Gonen, I.; Tas, T. and Kaya S.(2015). Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical sample and role of Quorum sensing signal molecules in the pathogenesis of the disease. Acta Medica Mediterranea. 31: 851.
30. Galloway, D.R. and Peters JE (1990). Purification and characterization of an active fragment of the Las A protein from *Pseudomonas aeruginosa*: enhancement of elastase activity. J. Bacteriol. *Mol. Microbiol*. 172: 2236-2240.
31. Vadlamani, S. and Parcha, S.R. (2011). Studies on industrially important alkaline protease production from locally isolated superior microbial strain from soil microorganisms. *Int J Biotechnol Appl*. 3(3): 102-105.
32. Selezska, K. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* population Structure revisited under environmental focus. Ph.D thesis . Universität Carolo-Wilhelmina.
33. Hussien, I.A. ; Habeb, K.A. and Jassim, K.A. (2012) . Identification of *Pseudomonas aeruginosa* from burn wounds isolates by PCR using exotoxin A-specific primers . *Iraqi J. Biotech*. 11(2): 282-291.
34. De Vos, D.; Lim, A.J.; Pirnay, A.; Jr.; Struelens, M.; Vandenvelde, C. Duinslaeger, L. et al. (1997). Direct detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples such as skin biopsy specimens and expectorations by multiplex PCR based on two outer membrane lipoprotein genes, *oprI* and *oprL*. *J Clin Microbiol*. 1997; 35(6): 9-1295.
35. De Vos, D. ; Bouton, C. ; Sarniguet, A. *et al*. (1998). Sequence diversity of the oprI gene, coding for major outer membrane lipoprotein I, among rRNA group I pseudomonads. *J. Bacteriol* .180: 6-6551.
36. Firoved, A. M. ; Ornatowski, W. and Deretic, V. (2004). Microarray analysis reveals induction of lipoprotein genes in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*: implications for inflammation in cystic fibrosis. *Infect Immun* 72, 5012–5018.
20. Janam, R. ; Gulate, A.K. and Nach, G. (2011) . Antibiogram and genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from human , animal , plant, water and soil sources in north India. Southeast. *Asian J. Trop. Med. Pub. Health*. 42(6):1477-1488 .
21. Kiffer **,** C.; Musiung, A.; Oplustil, C.; Sampaio, J.; Sakagami, E.; Turner, P. and Mends, C.(2005). Antimicrobial susceptibility of gram-negative bacteria in Brazilian hospital: the mystic program Brazil 2003. *Braz.j. infect*. Dis.9(3):216-224.
22. Abdulridha, S. and Alkaabi, G. (2012). Bacterial Isolates and Their Antibiograms of Burn Wound Infections in Burns Specialist Hospital in Baghdad. *J. Baghdad for Sci*. 10(2): 331-340.
23. Abdullah, R.M.; Samaan, S.F. and AL-Shwaikh, A.M. (2010) . study the effect of antibiotic combination of beta – Lactam and amino glycoside with another group of antibiotics and their synergism effect. *Journal of Arab Board of Health specialization*. Vol.11, No.1.

24. المحمداوي ، خولة جبر خلف .(2006). دراسة بروتين A-كعامل *Pseudomonas aeruginosa* من عوامل ضراوة بكتريا المعزولة من بيئات مختلفة مع التأكيد على الطبيعة الجزيئية الإنتاجية .أطروحة دكتوراه. كلية العلوم .الجامعة المستنصرية .

25. Altaai, M.E. ; Aziz, I.H. and Marhoon, A.A. (2014) . Identification *Pseudomonas aeruginosa* by *16SrRNA* gene for differentiation from others *Pseudomonas* species that isolated from patients and environment . *J. Bagh. Sci*. 11(2): 1028-1034.
26. Pereira, F.; Carneiro, J.; Matthiesen, R.; van Asch, B.; Pinto, N.; Gusmao, L.; Amorim, A. (4 October 2010). "Identification of species by multiplex analysis of variable-length sequences". *Nucleic Acids Research* 38 (22): e203–e203.doi:10.1093/nar/gkq865.
27. Khalil, M. A. E. ; Sonbol, F. I. ; Mohamed, A. B. and Ali, S. S.(2015). Comparative study of virulence factors among ESβL-producing and nonproducing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Turk J Med* Sci. 45:60 -69.
28. Bnyan, I. A. and Ahmed, H. (2013). Effect of some factors on extracellular hemolysin filtrate from bacterial *Pseudomonas aeruginosa* isolated from

P- ISSN 1991-8941 E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2017,11 (1) :20-29

Genetic identification of *Opr I* and *Opr L* Genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different local sources.

Mohammed E. Altaai Jamal A. Alhadithy Wissam K. Al Swediawy

Abstract:

P.aeruginosa bacteria are opportunistic pathogens capable of infection almost every tissue in the body as a result of possessing a large variety of virulence factors which significantly contribute to the pathogenicity of the host events. In the current study was to collect 119 samples from different clinical and environmental sources. to investigate the spread of bacteria *P.aeruginosa* and to study the virulence factors by a sample of 90 of those patients in several Hospitals in the city of Baghdad, including 33 samples of burns infections, 22 samples of wound infections, 17 samples of Otitis media infections, and 11 samples for urinary tract infections as well as 7 isolates belonging to patients with cystic fibrosis, The environmental samples included 10 samples of soil, 10 samples of water, and 9 samples of theaters. Diagnosed develop isolated after planted on different growth media through phenotypic traits and microscopic examinations and confirmed diagnosis using API 20E kit, as well as molecular diagnostics definitive diagnosis of isolates that give a positive result as bacteria *P.aeruginosa* during the previous tests were depending on the gene diagnosis *16SrDNA* with a special bacterial sequence of *P.aeruginosa*. Diagnostic results showed that 61 isolated a 51% belonging for the type of *P.aeruginosa* of the total clinical and environmental samples that were divided on 15 isolates 24.6% of cases of burns infections, 13 isolates 21.4% of cases of wound infections, 10 isolates 16.3% of cases of Otitis media infections, 5 isolates 8.3% of cystic fibrosis, 4 isolates 6.5% of cases of urinary tract infections, 6 isolates 9.8% of soil, 4 isolates 6.5% of water, and 4 isolates 6.5% of the galleries operations. The results of the phenotypic detections of some virulence factors showed that 95% of the isolates were producing hemolysin enzyme type β –hemolysis, while it was 93.44% of the isolates producing protease enzyme and to varying degrees, and the percentage of isolates producing pyocyanin pigment was 73.13%. The prevalence of some virulence factors of *P.aeruginosa* was investigated in both clinical and environmental isolates by molecular genetic methods, included these genes each of the genes encoded of fatty proteins *Opr I, Opr L.* The results showed the existence of genes (*Opr I*) increased by 100%, while the gene *Opr L* ratio was 96.72% within the genetic structure of the isolates studied.