التحري عن بعض جينات الضراوة *PLcH ,PLcN, exoS* في بكتريا الزوائف الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من المسالك البولية

وعد محمود رؤوف[1] ، شاميران محمود توفيق[2]

[1] كلية الصيدلة ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

[2] كلية التربية ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

الملخص

جمعت80 عينة من مرضى يعانون من التهابات في المسالك البولية ،زرعت على الاوساط الزرعية المختلفة و شخصت العزلات النامية من خلال الصفات المظهرية و المجهرية والزرعية ، أظهرت نتائج التشخيص بأن 20عزلة تعود للنوع *P.aeruginosa*، اختبرت حساسية هذه العزلات للمضادات الحيوية وأظهرت النتائج مقاومة جميع العزلات لمضادات , Cefixime , Ceftriaxon , Carbencillin بنسبة (100%) وابدت مقاومة بنسبة (60%) لمضادات Amikacin Gentamicin Tobramicin, وكانت اقل مقاومة لمضادات Cefepenim,Norfloxacin, Imipenem وبالنسب (10.2%),(9.2%) و(8%)، على التوالي، تم انتخاب9عزلات اعتمادا على قدرتها لمقاومة العديد من المضادات الحيوية لتقييم انتشار جينات *PLcH,PLcN,exoS* ضمن هذه العزلات بواسطة بادئات متخصصة باستخدام تقنية PCR ، أظهرت نتائج PCR وجود ألجين *exoS* المشفر للإنزيم الخارجي *S* بواقع 9/7 عزلات وبنسبة (77.77%) من العزلات المدروسة والجين *PLcH* المشفر للإنزيم الخارجي الهيمولايسين الحال للدم في 9/6عزلة اي بنسبة (66.66%) اما الجين *PLcN* المشفر للإنزيم الخارجي الهيمولايسين غير الحال للدم في9/7 عزلة اي بنسبة (77.77%) من عزلات بكتريا *P.aeruginosa* قيد الدراسة.

المقدمة

تعد جراثيم *P. aeruginosa* ممرضات انتهازية Opportunistic Pathogen من النادر ان تسبب المرض في الأشخاص السليمين ، تسبب اخماج القناة البولية UTI وتجرثم الدم Bacteremia واخماج العين Eye Infections واخماج الاذن Ear infections واخماج الجلد Skin infections واخماج الجهاز العصبي المركزي Central Nervous system infections والتهاب شغاف القلب Endocarditis واخماج العظم والمفصل Bone and Joint infections. وان الطيف الواسع من الامراض الناجمة يعتمد على امتلاكها عوامل ضراوة متعددة [1] .

ان ضراوة جرثومة *P. aeruginosa* ترتبط مع قدرتها على استعمار مواقع تشريحية مختلفة (بسبب امتلاكها ميكانيكيات التصاق فعالة ومتطلبات تغذوية قليلة ومقاومة للمضادات الحيوية) ولها قدرة على غزو الانسجة الموضعية وتحطيمها [2]،ان استعمار جرثومة *P. aeruginosa* لسطوح الاغشية المخاطية للانسجة الطلائية التنفسية يسهل بارتباطها مع الخلايا الظهارية بوساطة الاهداب Pili والشعيرات Fimbriae ويسهل الالتصاق بسبب ضرر سابق في النسيج[3] ،وتعتمد *P. aeruginosa* على غزو الانسجة على مقاومتها لعملية البلعمة Phagocytosis والدفاعات المناعية للمضيف وافرازها للانزيمات الخارجية والذيفانات التي تحطم الحواجز الفيزيائية وتشارك في الغزو البكتيري[4] . ان الغزو الموضعي وصفات التخريب تكون ذات علاقة متبادلة إذ تحرر *P. aeruginosa* عدد من الانزيمات الخارجية او الذيفانات التي تعمل انتقائيا على انسجة المضيف المختلفة مثل انزيمات Alkaline protease و Elastase وانزيم الـــــتجلط Coagulase و hemolysin و Lipase و gelatinase و DNase و Phosphatase alkaline و Lecithenase و Leukocidin فضلاً عن حاملات الحديد Siderphore و الذيفان المعوي Enterotoxin [5] و[6] .

يشفر الجين *plcH* لانتاج الانزيمات المحللة للدم ذات ضراوة قوية جداً حيث تسبب تثبيط عملية البلعمة الفعالة من قبل الخلايا العدلة وتحطم phosphatidal choline الموجود على سطوح الخلايا الطلائية ،اما الجين *PLcN* ينتج الانزيمات غير المحللة للدم ،ويفرز كل من *PLcN* و *PLcH* الى خارج الخلية من خلال مسار احلال محل ثنائي الارجنين (Twin-arginine traslocation)TAT من خلال الغشاء الداخلي ومن ثم من خلال متعدد السكريات الدهني بشكل مطوي،اما الجين ExoS تشفر لأنتاج الأنزيمات التي تفرز بشكل طبيعي من قبل (three type secretion system)TTSS وتوجد بغزارة في السلالات الغازية وهي من الأنزيمات القادرة على تحوير وظيفة خلايا اللبائن[7] و[8].

ازدادت الاهمية الطبية لهذه الجراثيم ليس لكونها ممرضات انتهازية فحسب ولكن لمقاومتها للعديد من المضادات الحيوية ، بسبب امتلاكها المقاومة الذاتية ، ومقدرتها على تطوير مقاومة جديدة عند التعرض للعوامل المضادة للبكتريا. كما انها من المسببات المهمة للاخماج المكتسبة من المستشفيات بسبب تواجدها في بيئة المستشفيات خاصة عند وجود الرطوبة وانتشارها من مريض الى اخر وعلى ايدي العاملين في المستشفيات واصابتها للمرضى المصابين بالكبت المناعي او الذين يتعالجون بالمضادات الحيوية واسعة الطيف [9] و [10] لذا جاءت الدراسة الحالية للتحري عن عوامل ضراوة هذه البكتريا على

المستوى الجزيئي في عزلات إصابات المجاري البولية وذلك من خلال تحقيق الاهداف التالية:

1- عزل وتشخيص بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من مرضى المجاري البولية.

2- توصيف العزلات مظهريا من حيث حساسيتها ومقاومتها للمضادات الحيوية

3- التحري عن جينات ضراوة هذه البكتريا مثل *plcH*, , *plcN*, *exoS*, على المستوى الجزيئي في عزلات هذه البكتريا المعزولة من المجاري البولية.

المواد وطرائق العمل

تم زرع العينات الماخوذة من مرضى خضعوا لعمليات القثطرة ومن التهابات المجاري البولية على وسط آكار الماكونكي ووسط الآكار نقيع القلب والدماغ ، ووسط آكار الدم التي حضنت عند (37)م° لمدة 24 ساعة واجريت الأختبارات البايوكيميائية اللازمة لتشخيص البكتريا وحسب الطرق القياسية المتبعة من قبل Fischbach [11]. انتخبت المستعمرات النامية التي تتصف بكونها غير مخمرة لسكر اللاكتوز والمحللة للدم تحللا كاملاً من نوع hemolytic-أو تحللاً جزئياً والتي نمت ولم تتثبط على وسط Cetrimide للتاكد من تشخيص الروتيني لـ *P.aeruginosa* باستخدام العدة التشخيصية Analytical profile IndexAPI 20E وحفظت العزلات على موائل الاكار، تم تلقيح 2-3 مستعمرات للعزلات المدروسة في أنابيب اختبار حاوية على وسط مرق منقوع المخ والقلب و أطباق حاوية على وسط اكار الدم وحضنت الانابيب والاطباق في درجة حرارة 42°م ولمدة 24 ساعة ولوحظت قدرتها على النمو في هذه الدرجة الحرارية التي استخدمت لتفريق *P. aeruginosa* عن بقية أنواع *Pseudomonas* [12]

اختبار الحساسية للمضادات الحيوية: درست حساسية بكتريا *P.aeruginosa* المعزولة تجاه (15) مضادا من المضادات الحيوية وبالاعتماد على طريقة Kirby Bauer المعدلة والموصوفة من قبل منظمة الصحة العالمية CLSI [13] .

دراسة المحتوى الوراثي للعزلات البكتيرية:

A – عزل الدنا الجينومي Genomic DNA isolation

استخدمت عدة استخلاص وتنقية الدنا الجينومي المجهزة من شركة Promega (USA) في عزل الدنا الجينومي للعزلات البكتيرية المشخصة

B – استخلاص وتنقية الدنا الجينومي :

تم اختيار (9) عزلات اعتمادا على قدرتها على مقاومة المضادات الحيوية لغرض استخلاص الدنا الجينومي منها باستخدام عدة استخلاص وتنقية الدنا الجينومي وحسب تعليمات الشركة المصنعة (Promega).

توصيف الدنا Characterization of DNA: إن عملية توصيف الدنا تضمنت ما يأتي :

قياس تركيز الدنا : اتبعت الطريقة التي وصفت من قبل Sambrook [14]لقياس تركيز وتقدير نقاوة الدنا، تم تقدير تركيز الدنا في العينة الاصلية بتطبيق القانون الاتي :

تركيز الدنا بالمايكرو غرام / مل = الكثافة الضوئية المقاسة عند الطول الموجي 260 × مقلوب التخفيف (100) × 50 مايكرو غرام / مل على أساس إن القراءة عند الطول الموجي 260 نانوميتر التي تساوي 1 تعادل تركيز الدنا المزدوج الشريط مقداره 50 مايكروغرام / مل، تم قياس درجة نقاوة الدنا من حاصل قسمة الكثافة الضوئية المقاسة عند الطول الموجي 260 نانوميتر على الكثافة الضوئية المقاسة عند الطول الموجي 280 نانوميتر إذ إن أفضل نقاوة للدنا تكون ما بين (1.8-2).

الترحيل الكهربائي للدنا على هلام الاكاروز : حضر الهلام بتركيز 0.8% وحسب الطريقة المعدة والموصوفة من قبل Mitov وجماعته [1].

مكونات تفاعل البلمرة المتسلسل: تم الحصول على مواد تفاعل البلمرة المتسلسل من شركة Promega (USA) مما يأتي:

محلول الدارىء لأنزيم التضاعف Taq DNA Polymerase 10x Buffer يحتوي على 100 ملي مولر Tris-HCL ذي رقم هيدروجيني (9.0) و500 ملي مولر KCL و (1%) Triton و 15 ملي مولر $MgCl_2$.مزيج القواعد الناتروجينية ثلاثية الفوسفات dNTPs يحتوي على 10 ملي مولر من كل من , dGTP ,dTTP dATP وكذلك dCTP وكما موضح في الجدول (1)، (2)،(3).

انزيم تضاعف الدنا Taq DNA Polymerase في دارئ الخزن من نوع B والمتكون من 20 ملي مولر Tris-HCL و100 ملي مولر KCL، ملي مولر EDTA و 50% من Tween20.

جدول (1) تبين تسلسلات القواعد النتروجينية للبادئات النوعية حسب ماورد من قبل Mitov. وجماعته [1]

ت	Target gene الجين الهدف	Sequence (5`– 3`) تسلسل البادئات	Product Size(bp) حجم الجين المتوقع	Primers البادئات
1	*plcH*	GAAGCCATGGGCTACTTCAA AGAGTGACGAGGAGCGGTAG	307	plcH-F plcH-R
2	*plcN*	GTTATCGCAACCAGCCCTAC AGGTCGAACACCTGGAACAC	466	plcN-F plcN-R
3	*exoS*	CTTGAAGGGACTCGACAAGG TTCAGGTCCGCGTAGTGAAT	504	exoS-F exoS-R

الجدول (2) برنامج تفاعل البلمرة المتسلسل حسب ماورد من قبلMitov. وجماعته[1]

برنامج البلمرة		
درجة الحرارة	الفترة الزمنية	عدد الدورات
94°م	5 دقائق	1
94°م	35 ثانية	30
60°م	45 ثانية	
72°م	45 ثانية	
72°م	7 دقيقة	1

جدول(3) مزيج تفاعل السلسلة المتبلمرة حجم25مايكروليتر حسب ماورد من قبلMitov. وجماعته [1]

ت	المكونات	حجم المادة المضافة
1	ماء مقطر	15.6µl
2	PCR Buffer1X	5µl
3	DNTPs	0.5µl
4	Primer-F	0.8µl
5	Primer-R	O.8µl
6	(1.5U)TaqDNA Polymerase	0.3µl
8	DNA	2µl
	الحجم الكلي	25µl

النتائج والمناقشة

التحري عن الجين *exoS*

اظهرت نتائج الترحيل الكهربائي وجود حزم وراثية حجمها الجزيئي504 bp مقارنة مع الدليل الحجمي 100 bp، مايشير الى وجود الجين *exoS* في7(77.77%) من عزلات *P. aeruginosa* وكما موضح في الشكل(1) ، اتفقت الدراسة الحالية تقريبا معFeltman وجماعته[15] والتي اعطت عزلاتهم نسبة 72.8% لـ *exoS* وكذلك دراسةAdam وجماعته [7]اذ أعطت جميع عزلاتهم نتيجة موجبة للجين، وقد اتفقت نتائج الدراسة مع دراسةSun وجماعته [16] اذ إظهرت عزلاتهم نسبة (72.3%) لجين *exoS* بين عزلات الأدرار اذ كانت نسبة الجينexoS(70.4%) بين عزلات الادرار أعلى النسب بين نسب جينات الضراوة ومع دراسةMitov وجماعته [1] وAntonov وجماعته[17] الذين أعطت عزلاتهم نسبة (72%)، ولم تتفق نتائج الدراسة ودراسة Lim [18] اذ كان معدل*exoS* بالادرار قليل جدا ،وتكون امراضية هذا الانزيم القدرة على تحور وظيفة خلايا اللبائن مثل خلايا الهيكل العظمي ويضعف هجرة الخلايا البلعمية الى مناطق الالتهابات وتعمل على إضطراب الحواجز بين الخلايا الطلائية ومنع البلعمة من قبل الخلايا العدلة كما إنها تمكن البكتريا من البقاء داخل الخلايا العدلة كما أن هذا الأنزيم يمنع التئام الجروح،مما تؤدي الى زيادة التدهور الصحي.

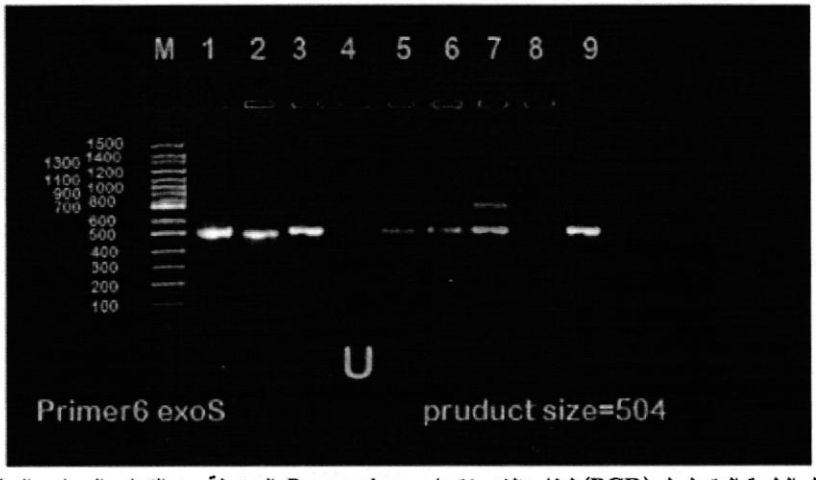
التحري عن جين الفوسفولايبيز غير الحال للدم *PLcN*

اظهرت نتائج الترحيل الكهربائي، وجود حزم وراثية حجمها الجزيئي bp 466 مقارنة مع الدليل الحجمي bp 100في9عزلات مايشير الى وجود الجين *PLcN* في7(77.77%) من عزلات *P. aeruginosa* وكما في الشكل(2)،لم تتفق النتائج مع Endimiani وجماعته الذين أعطت عزلاتهم[19] نسبة 64% لهذا الجين واظهر الجين سيادة في عزلات الدم وتلاها الادرار فالحروق، اتفقت الدراسة نوعا ما ودراسةTanya وجماعتها[20] التي اعطت عزلاتها نسبة (72%) ،ولم تتفق الدراسة الحالية مع دراسة كل منSun [16] و Heirmann [21] وAdam [7] اذ وجدوا نسب (90.3% و88% و100%و90.3%) بالترتيب لعزلاتهم المعزولة من مواقع اصابة مختلفة من الجسم، للزائفة الزنجارية ثلاث جينات تشفر لPLcs(*PLcB* و*PLcN* و*PLcH*) وجميعها لها دور في تحليل فوسفوتيدال كولينPCو ان الزيادة في نسب هذه الجينات الثلاث تؤدي الى تجرثم الدم وخاصة لو تواجد مع البروتيز لان هذين العاملين لها دور كبيرفي انتشار *P. aeruginosa* بين الانسجة [22] .

التحري عن جين الفوسفولايبيز الحال للدم *PLcH*

اظهر نتائج الترحيل الكهربائي، وجود حزم وراثية حجمها الجزيئي 307 bp مقارنة مع الدليل الحجمي 100 bp، وجود الجين *PLcH* في 6(.6666%) من عزلات *P. aeruginosa* قيد الدراسة وكما في الشكل(3) ،لم تتفق الدراسة الحالية معLama وجماعتها [22] وMitov وجماعته [1] وMorals وجماعته [23] و Adam وجماعته[7] اذ اعطت عزلات جميعهم نسبة(100%) لهذا الجين اما

Sun وجماعته [16] فكانت النسبة (95.2%)، ان *PLcH* ينتشر في شتى انواع الاصابات ويكون ذو سمية عالية ويعمل على تغيير وتبديل أشارات العمليات في حقيقية النواة كما ان تكوين الغشاء الحيوي يزداد بزيادة أستنساخ الجين *PLcH* التي تشفر لانزيمات العائلة الفائقة Super family enzymes التي تشمل عدد من الذيفانات الخارج خلويةHaemolytic phospholipase C (محلل للدم) الذي يحطم الانسجة عن طريق تحطيمها للبيبتيدات والليسيثين(تحليل فوسفاتيدال كولين) وانزيم Sphingomyelinase المحطم للانسجة مما يسهل دخول البكتريا واستقرارها وتجعل الاصابة اكثر حدة وتعمل ايضا على تثبيط الخلايا العدلة وهذا يجعل البكتريا اكثر مقاومة للاستجابة المناعية وهي إحدى الآليات المهمة التي تساعد البكتريا على البقاء في القنوات التنفسية [24] .



شكل (2) ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) لدنا عزلات بكتريا *P.aeruginosa* المعزولة من التهاب المجاري البولية باستعمال بادئات متخصصة لجينات *exoS* على هلام الاكاروز بتركيز (1.5 %) وفرق الجهد (60) فولت لمدة (2) ساعة

المسار M الدليل الحجمي (100 bp DNA Ladder)

المسار 1 ناتج عملية التضخيم لجين *exoS* في دنا العزلة Psa U1*

المسار 2 ناتج عملية التضخيم لجين *exoS* في دنا العزلة Psa U2*

المسار 3 ناتج عملية التضخيم لجين *exoS* في دنا العزلة Psa U3*

المسار 4 عدم ظهور ناتج في دنا العزلة Psa U4*

المسار 5 ناتج عملية التضخيم لجين*exoS* في دنا العزلة Psa U5*

المسار 6 ناتج عملية التضخيم لجين *exoS* في دنا العزلة Psa U6*

المسار 7 ناتج عملية التضخيم لجين *exoS* في دنا العزلة Psa U7*

المسار 8 دم ظهور ناتج في دنا العزلة Psa U8*

المسار 9 ناتج عملية التضخيم لجين *exoS* في دنا العزلة Psa U9*

*Psa – *P.aeruginosa* U* – Urine 1* – رقم العزلة

شكل (2) ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) لدنا عزلات بكتريا *P.aeruginosa* المعزولة من التهاب المجاري البولية باستعمال بادئات متخصصة لجينات *PLcN* على هلام الاكاروز بتركيز (1.5 %) وفرق الجهد (60) فولت لمدة (2) ساعة .

المسار M الدليل الحجمي (100 bp DNA Ladder)

المسار 1 ناتج عملية التضخيم لجين *PLcN* في دنا العزلة Psa U1*

المسار 2 ناتج عملية التضخيم لجين *PLcN* في دنا العزلة Psa U2*

المسار 3 ناتج عملية التضخيم لجين *PLcN* في دنا العزلة Psa U3*

المسار 4 ناتج عملية التضخيم لجين *PLcN* في دنا العزلة Psa U4*

المسار 5 عدم ظهور ناتج في في دنا العزلة Psa U5*

المسار 6 عدم ظهور ناتج في دنا العزلة Psa U6*

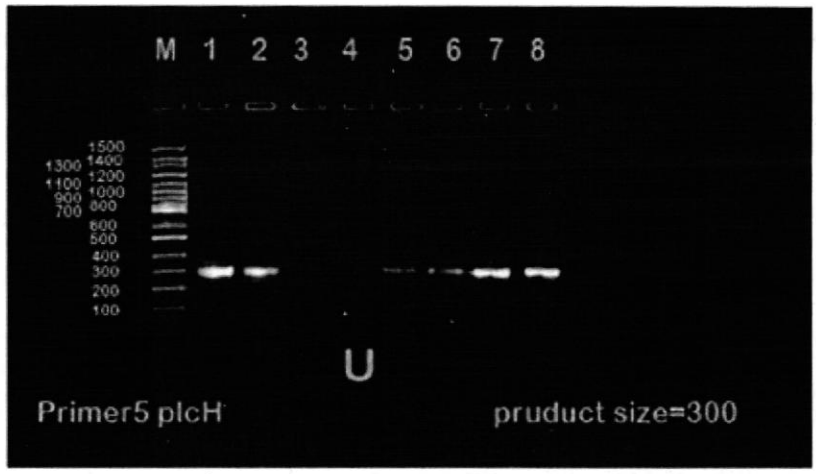
المسار 7 ناتج عملية التضخيم لجين *PLcN* في دنا العزلة Psa U7*

المسار 8 ناتج عملية التضخيم لجين *PLcN* في دنا العزلة Psa U7*

المسار 9 ناتج عملية التضخيم لجين *exoS* في دنا العزلة Psa U9*

عدم ظهور ناتج في دنا العزلةPsa ,U5,U6*

*Psa – *P.aeruginosa* U* – Urine 1* – رقم العزلة



شكل (3) نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) لدنا عزلات بكتريا *P.aeruginosa* المعزولة من التهاب المجاري البولية بأستعمال بادئات متخصصة لجينات *PLcH* على هلام الاكاروز بتركيز (1.5 %) وفرق الجهد (60) فولت لمدة (2) ساعة .

المسار M الدليل الحجمي (100 bp DNA Ladder)

المسار 1 ناتج عملية التضخيم لجين *PLcH* في دنا العزلة Psa U1*

المسار 2 ناتج عملية التضخيم لجين *PLcH* في دنا العزلة Psa U2*

المسار 3 عدم ظهور ناتج في دنا العزلة Psa U3*

المسار 4 عدم ظهور ناتج في دنا العزلة Psa U4*

المسار 5 ناتج عملية التضخيم لجين *PLcH* في دنا العزلة Psa U5*

المسار 6 ناتج عملية التضخيم لجين *PLcH* في دنا العزلة Psa U6*

المسار 7 ناتج عملية التضخيم لجين *PLcH* في دنا العزلة Psa U7*

المسار 8 ناتج عملية التضخيم لجين *PLcH* في دنا العزلة Psa U8*

المسار 9 عدم ظهور ناتج في دنا العزلة Psa U9*

عدم ظهور ناتج في دنا العزلة Psa U3,U4,U9*

Psa* – *P.aeruginosa* – U* Urine – 1* رقم العزلة

Refrences:

1- Mitov, I.; Strateva, T.; and Markova, B.(2010). Prevalence of virulence genes among bulgarian nosocomial and cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Braz. J. Microbiol. 41:3.

2- Tremblay, J.; Pascale,A.; and Richardsn, X. (2007). Self - produced extracellular stimuli modulated the *P. aeruginosa* swarming motility behaviour .Environmental. Microbiology., 9 (10): 2622 -2630

3- May,O.;and Tufenkji,M.(2011).The swrming of P.aeruginosa is blocked by cranbery proathocyanidians and other tanin-containing materials ., Environ .Microbiol.,77(9):3061-3067.

4- Tournier, D; Richardot, C.; Emeline, E.; Franke, M.; Smith, P.;Asperilla, Q.; and Muller, E.(2013).Co-dexity of resistance mechanisms to Imipenim intensive care unit strains of *Pseudomonas aeruginosa* . J. Antimicrob. Chemother ., 68(8): 1772-1788.

5- Wiehlmann, L.; Wagner, G.; Cramer, N.; Siebert, B.; Gudowius, P.; Morales, G.; Ko hler, T.; van Delden, C.; Weinel, C.; and Slickers, P.(2007). Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci USA., 104, 8101–8106. J. Antimicrob. Chemother ., 68(8): 1772-1788.

6- Ghassan, M.; Mater, M.; and Mirachaar, Z. (2005). Detection of high prevalent and potentialy virolence strain of *P. aeruginosa* from nosocominal infection in amedical center. BMC. Microbiology.,5,29.

7- Adam, B.; Vasil, A.;A.; and Michael, V. (2004). Anovel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* requireds of phospholipid monolipid. J. Mol. Mrobiology.,54(4):1089-1098.

8- Lamholt, J.; Poulsen, K.; and Killian, J. (2001). Epidemic pobulation structure of *P. aeruginosa*: Evidence for clone that is pathoginic to the Eye and that has adistinic combination of virolence factors Infect. Immun., 69(10): 6284- 6295

9- Mirsalehian, A.; Fezabadi,U.; Akbari, N. and Ameli.(2008).Prevalence of extended spectrum beta lactamases among strains of *P. aeruginosa* isolates from burn patients. Iranian. Medical. J. ISSN, 11(3): 244-255.

10- Mittal, R., Aggarwal, S.; Sharma, S.; Chhibber, S.; and Harjai , K. (2009). Urinary tract infection causing by *P. aeruginosa* Aminireview. J.inection and Public Health , 2, 101-111.
11- Fischbach, F. (2007). Amanaual of Laboratory and diagnostic tests. 6ted. Lippincott New York.
12- Holt, J.G.; Kreig, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, T.T. and Williams, S.T. (1994). "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". 9th ed., Williams and Wilkins, pp. 151-1
13- Clinical and labratory standards institute CLSI. *Performance* Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing:. Wayne,(2009). 181 p. M100-S-18 Eighteenth Informational Supplement.
14- Sambrook, J .; Fritsch and Maniatis,T. (1989). Molecular cloning : a laboratory manual , 2nd ed. Cold Spring Harbor , N . Y .62-69.
15- Feltman, H.; Schulert, G.; khan, S.; and Hauser, A.(2001).Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolate of *P. aeruginosa* .J. Microbiol ., 147(10):2659-2669.
16- Sun, Y.; Karmakar, M.; Taylor, P.; Rietsch, A.; and Pearlman ,E .(2012) .exo S and exoT ADP ribosyltrasferase activities mediate *P. aeruginosa* Keratitis by promoting Neutrophil Apoptosis and bacterial survival .J.Immunol.10,4049-4061.
17- Antonov, A.; Altukhova V.; Savchenko S.; Tkachenko A.; Zamaraev S.; Zhukova I.; Kramar G.; Matveeva L.; Ostrovski V.;and Dudchenko P.(2010). Molecular genetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from environment and patients in health care facilities., Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.,3 (2):8-13.
18- Lim, A.; Pirnay, S.; Vosed, D.; and Vandenelad, C.(2007). Direct detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples such as skin biobsy specimens and exopectorations by multiple PCR on two outer membrane lipoprotien genes ,OprLand OprI. J. Clin. Microbiol., 35(6): 1295-1299
19- Endimani, A.;Pini, B.; Boj, A.; and Toniolo, A.(2007).Blood stream infection due top aclinical outcome associated with pathogemesis- related gene. European society of clinical Microbology and Infections disease., 3(7):1164-1180.
20- Tanya, Z.; Strateva, K.; Guergana, B.; Petrova, N.; and Mitov, I. (2009). Bulgarian Cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates antimicrobial suceptibilty and nuraminidase -encoding gene distribution. .Braz. J. Microbiol 58(5) : 690-692.
21- Heirman, G.; Yang, L.; Wu, H. ;Song, Z.; Wang, H.; Hoiby, N.; Ulrich, M.; Mollin, S.; and Doring, G. (2012). J. Infection Diseases., 202(10):1585-592.
22- Lama, Z.; Khairallah, M.; Sabra, A.; and Ghassan, M.(2012). Expression levels of virolence factors with up-regulated of hemolytic phospholipase C in biofilm forming *P. aeruginosa* at Tertiary care center. J. Microbiol ., 177(12):2266-2288.
23- Morals, R..; Gloria, G.; Pelgado, G.; and Alejandrow, G. (2012).Genetic and phenotypic characterization of *P. aeruginosa* population with high frequency of genomic island. PLOSO.ONE. 7 (5):37459.
24- Truan, A.; Adriana, B.; Vasil b, G.; Martin, V.; Stonehouse, M.; Michael, L.; and Vasil , I.(2013). Pohl High- level over-expression, purification, and crystallization of a novel phospholipase C / sphingomyelinase from Pseudomonas aeruginosa. J. Protein Expression and Purification, 90,40–46.

Detection of virulance genes *PLcH* ,*PLcN*, *exoS* in *Pseudomonas aeruginosa* isolates of urinary tract infection

Waad M. Raoof , Shameran M. Tawfiq
[1] *pharmacy College , Tikrit University, Tikrit , Iraq*
[2] *Education. College, Tikrit University, Tikrit, Iraq*

Abstract:
Collected 80 samples from patients with suffered of the urinary tract , cultured on different media and diagnosed isolates through phenotypic and culturing characteristics, showed the results of the diagnosis that the 20 isolates belonging to the type *P.aeruginosa*, tested the sensitivity of these isolates to antibiotics and the results showed resistance of all isolates to antibiotics Carbencillin,, Ceftriaxon, Cefixime by (100%) and demonstrated resistance by (60%) of the Gentamicin Tobramicin, Amikacin and were less resistant to antibiotics Cefepenim, Norfloxacin, Imipenem in ratio(9.2%), (10.2%) and (8%) respectively , were selected 9 isolates depending on its ability to resist many of the antibiotics to evaluation the spread of genes *PLcH*, *PLcN*, *exoS* within these isolates by specialized primers using the technique of PCR, showed the results of PCR the presence of gene *exoS* which encoded external S enzyme in rate 9/7 isolates and by (% 77.77) of the isolates and the gene *PLcH* which encoded external enzyme haemolysin (the blood haemolysis) in the 9/6 isolation at a rate (% 66.66) either gene *PLcN* encoded external haemolysin enzyme (the blood non haemolysis) in the 9/7 isolation at a rate (% 77.77) *P.aeruginosa* isolates of bacteria under study .