التحري عن الجين *exo S* و بعض عوامل الضراوة المظهرية لجراثيم *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة سريريا في مدينة كركوك

أ.د. إبراهيم صالح احمد الجبوري / جامعة كركوك / كلية التربية الحويجة
جنار غالب بختيار/ جامعة كركوك / كلية العلوم / قسم علوم الحياة

الخلاصة : ـ

شخصت في هذه الدراسة (٢٥) عزلة من جراثيم *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*) ، في مدينة كركوك حيث تضمنت (١٧) عزلة (٤١,٤٦%) من حالات أخماج الحروق ، (٤) عزلات (٨,٣٣%) من أخماج الجروح ، (٣) عزلات (٥,٣٥%) من أخماج المجاري البولية و (١) عزلة (٢,٨٥%) من أخماج الأذن . اختبرت حساسية العزلات الجرثومية تجاه عدة مضادات من اصناف مختلفة متداولة سريريا واظهرت النتائج بان العزلات الجرثومية كانت مقاومة للمضاد Amoxicilin بنسبة (١٠٠%) بينما اظهرت العزلات نسب متفاوتة بالمقاومة لمضادات (Ciprofloxacin، Aztreonam، Gentamicin، Imipenem) والتي بلغت (٢٨%،٦٤%،٨٨%، ٩٦%)**على التوالي . في حين لم تظهر اي عزلة مقاومة للمضاد الحيوي** Colistin ، **حيث بلغت نسبة الحساسية لهذا المضاد** (١٠٠%). بينت نتائج الكشف المظهري عن بعض عوامل الضراوة المظهرية بأن **جميع العزلات منتجة للمحفظة** Capsule**وانزيم البروتييز** protease **بنسبة** (١٠٠%) ، **في حين كانت** (٩٢%) **من هذه العزلات منتجة لإنزيم الهيمولايسين نوع بيتا**hemolysis– β **و**(٨٠%) **منها مكونة للغشاء الحيوي** Biofilm ، **كما اظهرت نتائج التحري عن جين** *exo S* **باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل** PCR **امتلاك جميع عزلات الدراسة لهذا الجين وبنسبة** (١٠٠%).

المقدمة:

تعد جراثيم *P.aeruginosa* احدى اهم المسببات المرضية الانتهازية Opportunistic pathogens التي تسبب انواع مختلفة من الإصابات في المرضى الراقدين في المستشفيات ، وعلى الرغم من التقدم الحاصل في الرعاية الطبية والجراحية وادخال مجموعة واسعة من المضادات الجرثومية ذات الفعالية الجيدة لاتزال هذه جراثيم مستمرة في قدرتها على احداث مضاعفات العدوى المكتسبة من المستشفيات hospital acquired infections التي اصبحت مهددة للحياة (٤٩). تسبب هذه الجراثيم العديد من الامراض للإنسان منها اخماج

العين ، اخماج الأذن ، اخماج القناة البولية والجروح والحروق ، كما تشكل خطرا كبيرا على المرضى الذين يعانون نقصاً في المناعة Immunodeficiency patientمنهم مرضى السرطان والايدز فضلا عن الاشخاص المصابين بالتليف الكيسي Cystic fibrosis (٥١) . تمتلك جراثيم *P.aeruginosa* قابلية كبيرة على غزو الانسجة وتحطيمها وانتاج السموم وهذا يعود الى عوامل الضراوة المتعددة التي تمتلكها والمتمثلة بالانزيمات المحللة للدم (Hemolysin) والانزيمات المحللة للدهون (Lipase) والانزيمات المحللة للبروتين(Protease) (٥٢) فضلا عن الانزيم الخارجي S exoenzymeالذي يعد من عوامل الضراوة المهمة في جراثيم *P.aeruginosa* اذ يمتلك هذا الانزيم فعالية activity Ribosylating–ADP وهو قادر على نقل جزء ribosyl–ADP من NAD الى البروتينات والذي غالباً ما يؤدي ال تكوين الاورام او قتل الخلايا حقيقية النواة بسبب سميته وقدرته على تثبيط تخليق الحامض النووي DNA في الخلية فضلا عن تثبيط عملية البلعمة (٢٦). يشفرالأنزيم الخارجي S Exoenzyme لـ النظام الافرازي السمي نمط٣ Type 3 Secretion System الذي يعد من الخصائص المهمة للكثير من الجراثيم السالبة لملون كرام ومن عوامل الضراوة المسببة للاصابات الحادة في الانسان ، ويتفعل هذا النظام عند اتصال الخلية الجرثومية بالخلية المضيف اذ يعمل على تسهيل افراز ونقل السموم الى الخلية الهدف بصورة مباشرة من خلال الثقوب المتكونة في الغشاء الخلوي (٥٠) ، كما تنتج هذه الجراثيم المحفظة التي تعلب دورا مهما في تثبيط عملية البلعمة وابطال عمل الاجسام المضادة (٥٧).ان صعوبة علاج الاصابات الناجمة عن هذه الجراثيم تعود الى مقاومتها المتعددة تجاه العديد من المضادات الحياتية فضلا عن مقاومتها الذاتية Intrinsic resistance وما لديها من الخصائص الوراثية التي تعمل على ابعاد تاثير المضاد (٣٨) .

نظرا لخطورة هذه الجراثيم وقدرتها على احداث العدوى لكونها من الممرضات الانتهازية التي تسبب اصابات ثانوية لاسيما في المستشفيات فقد جاءت هذه الدراسة بهدف عزل وتشخيص جراثيم *P.aeruginosa* من حالات سريرية مختلفة واختبار حساسيتها للمضادات الحيوية فضلا عن التحري عن الجين *S exo* المشفر للانزيم الخارجي S ودراسة قابلية العزلات على انتاج بعض عوامل الضراوة مظهريا .

المواد وطرق العمل Materials and Methods

١- جمع العينات Collection of Samples

جمعت (١٨٠) عينة من نماذج مرضية مختلفة في مستشفى كركوك العام ومستشفى ازادي التعليمي وللفترة من آذار - آب (٢٠١٧) شملت مسحات الحروق والجروح والاذن فضلا عن عينات الادرار التي جمعت في انابيب بلاستيكية محكمة ثم نقلت العينات الى المختبر لغرض العزل والتشخيص .

٢-العزل والتشخيص Isolation and identification

زرعت العينات على اوساط (اكار الدم ،اكار السيدوموناس، اكار الماكونكي) وحضنت في درجة حرارة ٣٧ °م ولمدة٢٤ ساعة للتعرف على الصفات المظهرية من خلال الحصول على مستعمرات نقية ومفردة. شخصت

العزلات اعتمادا على الفحص المجهري والفحوصات الكيموحيوية وفق ما جاء في (٣٥،١٣،٥٥،٤٨،٢٤) كما تم تأكيد تشخيص **العزلات الجرثومية باستخدام نظام التشخيص** API20E.

-٣اختبار الحساسية للمضادات الحيوية **Antibiotics Sensitivity Test**

تم اجراء اختبار حساسية العزلات المشخصة للمضادات الحيوية بالاعتماد على طريقة (Kirby – Bauer method **) وفق ما جاء في** (١٩) **بتحضير عالق جرثومي متجانس ومقارنته مع انبوب ماكفرلاند** (٠,٥) **القياسي** (tube Macfarland) الذي يعادل ($١٠^{٨} \times ١,٥$ خلية/مل) ،نشر العالق على وسط مولر _ هنتون الصلب باستخدام مسحة قطنية بطريقة التخطيط وباتجاهات مختلفة لضمان توزيع العالق بشكل متساوي ، تركت الاطباق لتجف في درجة حرارة الغرفة ولمدة (١٠) دقائق، ثم ثُبتت اقراص المضادات الحيوية المستخدمة على سطح الوسط باستخدام ملقط معقم وبأبعاد مناسبة ، بعدها حُضنت بدرجة حرارة (٣٧) °م ولمدة (٢٤-١٨) ساعة، قيست اقطار مناطق التثبيط الخالية من النمو حول الاقراص ثم قورنت النتائج مع جداول قياسية وعالمية (٢١) .

الكشف عن عوامل الضراوة Detection of virulence factors

-١انتاج المحفظة Capsule formation

تم اجراء الاختبار باستخدام تحضيرات الحبر الهندي بوضع قطرة من صبغة الحبر الهندي على سطح شريحة زجاجية ،ثم نُقلت اليها مستعمرة فتية ومُزجت مع الصبغة بشكل جيد باستخدام الناقل الجرثومي (Loop) وغُطيت بغطاء الشريحة ، ثم فحصت الشريحة باستخدام العدسة الزيتية ، تم الاستدلال على وجود المحفظة برؤية فسحة مضيئة حول الخلية الجرثومية غير مصبوغة بالحبر الهندي (٤٣) .

-٢تكوين الغشاء الحيوي Biofilm formation test

تم استخدام طريقة الانابيب Tube methodللكشف عن قابلية الجراثيم على تكوين الاغشية الحيوية ، زُرعت العزلات الجرثومية في أنابيب إختبار حاوية على وسط نقيع القلب _ الدماغ السائل ثم حُضنت بدرجة حرارة (٣٧) ° م لمدة يومين ، سكب السائل الطافي واضيفت للأنابيب صبغة السفرانين بتركيز (٠,١) ، ثم غسلت الانابيب بالماء المقطر (ثلاث مرات) وتركت لتجف في الهواء ، عُدت النتيجة موجبة بظهور طبقة من المواد الملونة ملتصقة بجدار الانبوبة الداخلي (٤٥؛٢٠) .

-٣إنتاج البروتييز Protease production

زُرعت العزلات الجرثومية على وسط الحليب الفرز الصلب ١٢,٥% بطريقة التخطيط على سطح الوسط ، ثم حضنت الاطباق بدرجة حرارة (٣٧) °م لمدة (٢٤) ساعة. اظهرت العزلات المنتجة لإنزيم البروتييز مناطق رائقة حول مستعمراتها (١٧).

٤-انتاج الهيمولايسين production Haemolysin زرعت العزلات الجرثومية بطريقة التخطيط على وسط اكار الدم المضاف اليه ٥% من كريات الدم الحمراء ، ثم حُضنت الاطباق بدرجة حرارة (٣٧) °م ولمدة (٢٤) ساعة .تم التحري عن انتاج الانزيم بظهور منطقة تحلل كامل للدم حول المستعمرات النامية (٣١).

استخلاص الحامض النووي DNAالجرثومي Bacterial genomic DNA Extraction

تم استخلاص الحامض النووي DNA حسب التعليمات المرفقة لعدة الاستخلاص (gDNA Mini presto™ Bacteria kit) والمجهزة من شركة (Geneaid (Korea ،كما تم قياس تركيز الحامض النووي ونقاوته من خلال استخدام جهاز القطرة النانوية (Spectrophotometer Nanodrop) وقراءة الامتصاصية عند الطول الموجي ٢٨٠/٢٦٠ nm.

التحري عن الجين *S exo* Detection of *S exo* gene

تم استخدام البادئات النوعية المستهدفة للجين *S exo* وفقا لما جاء في (٤٠) وجهزت من من قبل شركة (Bioneer (Korea وكما مبين في الجدول (١)، تم تحضير مزيج التفاعل حسب التعليمات المرفقة لعدة تفاعل البلمرة المتسلسل PreMix PCR ®AccuPower المجهزة من قبل شركة (Bioneer (Korea باضافة الحجوم والتراكيز المطلوبة وكما مبين في الجدول (٢)، واخيرا تمت برمجة جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل واجراء خطوات التضاعف كما في الجدول (٣).

جدول (١) البودائ النوعية المستخدمة للجين *S exo* وحجم الناتج لكل بادئ

البادئ	تتابع البادئ ٥´ ـــــ ٣´	حجم الناتج bp	المصدر
exoS	F 5 CTTGAAGGGACTCGACAAGG 3	٤٥٠	(٤٠)
	R 5 TTCAGGTCCGCGTAGTGAAT 3		

جدول (٢) المكونات اللازمة للتفاعل

المكونات		الحجم المضاف للتفاعل مجفد
الخليط الاساسيPremix		
البادئ الامامي Forward	primer	١ مايكروليتر
البادئ الخلفي	primer	١ مايكروليتر

Reverse	
الحامض النووي القالب DNA template	١ مايكروليتر
ماء منزوع الايون ddH_2O	١٧ مايكروليتر
الحجم النهائي	٢٠ مايكروليتر

جدول (٣) خطوات التضاعف للكشف عن الجين *S exo*

الخطوات	درجة الحرارة	الزمن	عدد الدورات
المسخ الاولي Denaturation Pre-	٩٥ م°	٥دقائق	١
المسخDenaturation	٩٥ م°	٢٠ ثانية	٣٠
الارتباطAnnealing	٥٧° م	١ دقيقة	
الاستطالةExtension	٧٢ م°	١ دقيقة	
الاستطالة النهائيةFinal Extension	٧٢ م°	٥ دقائق	١

الترحيل الكهربائي الهلامي gel electrophoresis

اجري الترحيل الكهربائي لقراءة نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل باستخدام هلام الاكاروز المحضر بتركيز (٠,٨%) تحت فرق جهد (٧٥) فولت لمدة(ساعة و١٥ دقيقة) وباستخدام طول موجي قدره (٣٥٠) نانوميتر.

النتائج والمناقشة Results and Discussion

أجري التشخيص الزرعي للعزلات الجرثومية اعتمادا على صفاتها المظهرية على الأوساط الزرعية حيث ظهرت الجراثيم على وسط اكار الماكونكي بشكل مستعمرات كبيرة، محدبة ، شاحبة اللون لعدم تخميرها لسكر اللاكتوز وذات رائحة شبيهة برائحة العنب المتخمر، كما زرعت العزلات على وسط اكارالدم الإغنائي التنشيطي لتحديد قابلية الجراثيم على تحلل الدم وتحديد نوع التحلل ، اذ اظهرت معظمها هالة شفافة حول المستعمرة والتي تشير الى التحلل الكامل للدم β–hemolysis. لتأكيد التشخيص أعيد زرع العينات على وسط اكارالسيدوموناس الإنتقائي الخاص بهذه الجراثيم، وحضنت بدرجة حرارة (٤٢)° م ، إذ إتصفت المستعمرات في العزلات غيرالمنتجة للصبغات بشكلها الدائري المنتظم وبلونها الكريمي ،كما أظهرت غالبية العزلات الجرثومية قابليتها على انتاج صبغات Pyocyanin و Pyoverdin كما لوحظ من خلال الفحص المجهري للعزلات بأنها ذات تفاعل سالب لصبغة كرام ،عصوية ، مفردة او بشكل سلاسل قصيرة، اما بالنسبة للاختبارات الكيموحيوية التي شملت (الكتاليز ،الاوكسديز ، الإندول ، احمر المثيل، فوكس بروسكاور، و اختبار استهلاك الستريت) كانت

النتائج موجبة في اختبارات (استهلاك السترات،الكتاليز،الاوكسديز) فقط، كما اتصفت العزلات بعدم قابليتها على انتاج غاز CO_2 و S_2H كما تم تاكيد تشخيص العزلات باستخدام اشرطة API20E التي اظهرت نتائج مطابقة لنتائج الفحوصات الكيموحيوية .

اظهرت نتائج الزرع والتشخيص لـ (١٨٠) عينة مأخوذة من مصادر سريرية مختلفة بأن (٢٥) عزلة (١٣,٨٨%) تعود للجرثومة المستهدفة (جدول١)، وهذه النتيجة متفقة مع التي حصلت عليها الباحثة (٥) في مدينة الديوانية ، حيث كانت نسبة عزل هذه الجراثيم في العينات السريرية المأخوذة في الدراسة (١٤,٣%)، في حين ارتفعت الى (٣٥,٢٩%) في الدراسة التي اجرتها (١٠).بينت نتائج الدراسة ان اعلى نسبة عزل لجراثيم *P.aeruginosa* كانت من اخماج الحروق بنسبة (٤١,٤٦%) (جدول٤)، توافقت هذه النسبة مع التي حصل عليها الباحث (١١) في دراسته ،إذ وجد ان جراثيم *P.aeruginosa* هي الأكثر عزلاً من أخماج الحروق وبنسبة (٤١,١%)، بينما لم تتفق هذه النسبة مع التي سجلها (٢) والتي شكلت (٦٧,٦%) .اوضحت نتائج الدراسة بأن نسبة عزل جراثيم *P.aeruginosa* من اخماج الجروح بلغت (٨,٣٣%) (جدول٤) ، وهي توافق النسبة التي جاءت بها (٤١) في دراستها، حيث ذكرت ان نسبة جراثيم *P.aeruginosa* المعزولة من الجروح شكلت (٩,١٨%) ،بينما ارتفعت الى (١٦,٦%) في دراسة (١٦) . كما بينت النتائج ان عزلات *P.aeruginosa* التي جمعت من الإدرار كانت (٥,٣٥%) (جدول٤)، وهي متفقة مع دراسة (١٢) والتي بلغت (٦%) ، في حين لم تتفق هذه النتيجة مع نتيجة دراسة (١) ، حيث بلغت نسبة عزل هذه الجراثيم من عينات الإدرار(٤٠%). اما العزلات التي تم الحصول عليها من أخماج الأذن والتي بلغت (٢,٨٥%) (جدول٤)، ، فجاءت متفقة مع النسبة التي سجلتها الباحثة (٣) التي عزلت هذه الجراثيم من اخماج الأذن بنسبة (٤%) ، بينما اختلفت عن النسبة التي حصلت عليها (٩) في دراستها والتي بلغت (٣٨,٧%) . يعزى السبب في ارتفاع نسبة العزل في عينات الحروق التي لوحظت في الدراسة الحالية الى تلف خلايا الجلد عند تعرضها للحرق ، والمساحة الكبيرة الناجمة عن الإصابة التي توفر لهذه الجراثيم البيئة الملائمة لغزو واستعمار الأنسجة وتكوين الأغشية الحيوية على كامل الجزء المصاب ، إذ ينتج عن ذلك زيادة فترة الإصابة بهذه الجراثيم وبالتالي صعوبة العلاج بالمضادات الحيوية (٤٢;٤٤) . اما التباين والتقارب في نسبة عزل الجرثومة من باحث لآخر فيعود الى عدة اسباب منها عدد العينات التي تجمع من قبل الباحثين، وقت جمع العينات ،مكان الأخذ والبيئة ، اضافة الى المستوى الاجتماعي والاقتصادي للمرضى والثقافة الصحية لدى المصابين و درجة الاهتمام بنظافة ردهات المستشفيات وانواع المعقمات المستخدمة (٣٤).

جدول (٤) اعداد ونسب جراثيم *P.aeruginosa* حسب مصادر العزل

مصادر العزل	العدد الكلي للعينات	عزلات *P. aeruginosa*	
		العدد	النسبة
الحروق	٤١	١٧	%٤١,٤٦

الجروح	٤٨	٤	%٨,٣٣
الادرار	٥٦	٣	%٥,٣٥
الاذن	٣٥	١	%٢,٨٥
المجموع	١٨٠	٢٥	%١٣,٨٨

لوحظ من خلال نتائج فحص الحساسية للمضادات (جدول٥) ان جراثيم *P.aeruginosa* قد ابدت مقاومة عالية لمضادات البيتالاكتام منها مضاد Amoxicilinو بنسبة (١٠٠%) وهي تتفق مع التي جاءت في دراسة (٧)، والذي ذكر بان جميع العزلات كانت مقاومة للمضاد Amoxicilin ، كما شكلت نسبة مقاومة العزلات للمضاد Imipenem (٩٦%) والتي توافقت مع دراسة (٥٤) التي اجريت في طهران والتي بلغت (٩٤,٧%)، في حين وجد ان (٦٤%) من العزلات ابدت مقاومة للمضاد Aztreonam ، وهذه النتيجة متوافقة مع سجله (٢٨) الذي وجد ان نسبة العزلات المقاومة لهذا المضاد بلغت (٦٠%)، بالرغم من فعالية هذه المضادات الا ان نتائج الدراسة الحالية اظهرت مقاومة من قبل جراثيم *P.aeruginosa* ضدها ، وهذا يعود الى امتلاك هذه الجراثيم عدة آليات تساعدها على مقاومة مضادات البيتالاكتام تتمثل اهمها بانتاج انزيمات البيتالاكتاميز β-lactamaseالمحطمة لحلقة البيتالاكتام في المضاد والتي تؤدي الى تحوير تركيب المضاد وابطال تاثيره ، او من خلال انخفاض نفاذية الغشاء الخارجي membrane Outre و وجود مضخات الدفق Efflux pump (١٨).

جدول (٥) نتائج اختبار حساسية عزلات جراثيم *P. aeruginosa* للمضادات الحيوية قيد الدراسة

المضادات	الرمز	عزلات جراثيم *P. aeruginosa*					
		المقاومة		متوسطة الحساسية		الحساسة	
		العدد	النسبة %	العدد	النسبة %	العدد	النسبة %
Amoxicillin	AMC	٢٥	%١٠٠	-	-	-	-
Aztreonam	ATM	16	64%	4	16%	5	20%
Imipenem	IMI	24	96%	1	4%	-	-
Ciprofloxacin	CIP	7	28%	10	40%	8	32%
Gentamicin	GM	22	88%	3	12%	-	-
Colistin	CO	0	%0	-	-	25	100%

كما ان نسبة المقاومة لمضاد Ciprofloxacin الذي يقع ضمن مجموعة الكينولونات Quinolones كانت (٢٨%) ، توافقت هذه النتيجة مع نتيجة دراسة (١٤) ،الذي سجل نسبة مقاومة (٣٠%) ، وتتفق ايضاً مع ما سجله (٢٩) ، الذي بين ان نسبة مقاومة جراثيم *P.aeruginosa* لمضاد Ciprofloxacin كانت ٣١,٢%)) ، ان مقاومة جراثيم *P.aeruginosa* لهذه المجموعة من المضادات قد تعود الى حصول طفرة في الانزيم الهدف DNA gyrase (A-gyr) فضلا تغير نفاذية الغشاء الخارجي للدواء ، وقد تحمل جينات المقاومة لهذا المضاد على البلازميد او الكروموسوم (٤٧). اما المضاد Gentamicin العائد الى مجموعة الامينوكلايكوسادات Aminoglycosides فقد بلغت نسبة العزلات المقاومة له (٨٨%) ، والتي توافقت مع ما جاء به الباحث (٤) في دراسته ،اذ بلغت نسبة العزلات المقاومة لمضاد Gentamicin (٩٣%)، كما ان النسبة التي سجلت في دراسة (٦) كانت (٨٢,٥%). ان الالية الرئيسية في مقاومة الجراثيم لهذه المضادات هي الانزيمات المحورة Aminoglycoside modifying enzymes(AMEs) المتمثلة بانزيم N-acetyl transferase والانزيم Phosphotransferase حيث ان الجينات المشفرة لهذه الانزيمات قد تكون محمولة على الكروموسوم او البلازميد (٢٢) ، فضلا عن التغيير في نفاذية الغشاء او حدوث الطفرات الكروموسومية لمستقبلات المضاد على الرايبوسوم (٣٧). بينت نتائج الاختبارعدم ظهورالمقاومة للمضاد Colistin، وهي من الببتيدات الكلايكودية Glycopeptide التي تعمل على تثبيط وظيفة الغشاء الخلوي في الجراثيم ، توافقت هذه النسبة مع التي سجلها (٣٢)،اذ لم تظهر العزلات الداخلة في دراسته اي مقاومة للمضاد Colistin ، كما شكلت النسبة (٤,٥%) في الدراسة التي قام بها (٥٣) ، قد يعود السبب في انخفاض مقاومة جراثيم *P.aeruginosa* لمضاد الكولستين الى ندرة استخدامه بسبب سميته العالية للكلية ، لذا فان قلة الاستعمال ينتج عنه قلة ظهور المقاومة ، كما ان استخدامه يكون بعد خلطه مع مضادات حيوية اخرى ٣٩)) .

اظهرت نتائج التحري عن بعض عوامل الضراوة التي تمتلكها جراثيم *P.aeruginosa* (جدول٦) بان (٩٢%) من العزلات اظهرت قابليتها على تحلل انتاج انزيم الهيمولايسين المحلل لدم نوع بيتا β-hemolysin ، وهي متوافقة مع نتيجة دراسة (٣٠) الذي وجد نسبة العزلات المنتجة لهذا الانزيم (٩٥%)، كما بينت النتائج أن (٨٠%) من العزلات ابدت قدرتها على تكوين الاغشية الحيوية ، لم توافق هذه النسبة تلك التي حصل عليها (١٥) والتي انخفضت الى (٦٨%). كما لوحظ قدرة جميع العزلات على انتاج المحفظة وانزيم البروتييز ، جاءت هذه النتيجة متفقة مع عدد من الدراسات حيث بينت دراسة الباحثة (٣) أن جميع عزلات جراثيم *P. aeruginosa* في دراستها كانت منتجة للمحفظة ، كما سجل (٨) ان نسبة العزلات الجرثومية المنتجة للبروتييز كانت (١٠٠%) و بلغت (٩٣%) في دراسة (٤٦).

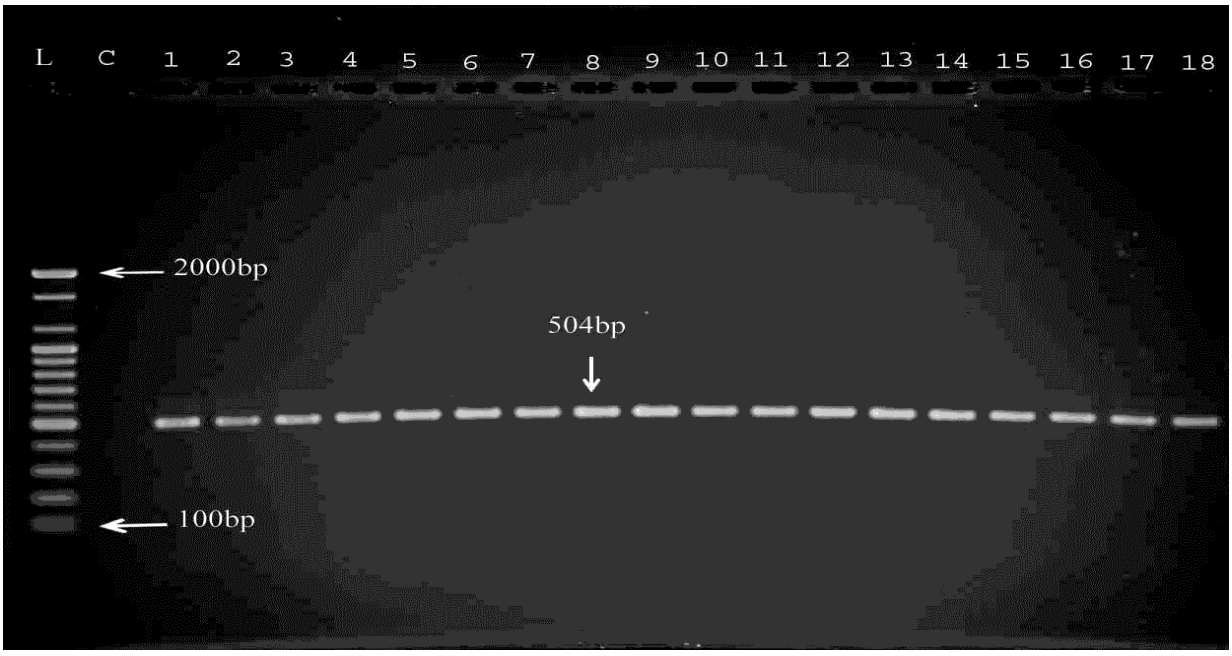
جدول (٦) عوامل الضراوة المنتجة من قبل جراثيم *P.aeruginosa*

العزلات	عوامل الضراوة

	انتاج المحفظة العدد (%)	انتاج البروتييز العدد (%)	تكوين الغشاء الحيوي العدد (%)	انتاج الهيمولايسين العدد (%)
٢٥	٢٥(١٠٠%)	٢٥(١٠٠%)	٢٠ (٨٠%)	٢٣ (٩٢%)

اظهرت نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل بأن جميع عزلات *P.aeruginosa* في الدراسة الحالية تمتلك الجين (*S exo*) بنسبة (١٠٠%)،توافقت النسبة في هذه الدراسة مع التي جاءت في دراسة (٥٦) الذي بين ان نسبة وجود الجين (*S exo*) في العزلات المدروسة كانت (١٠٠%) ، كما بلغت(٨٦%) في دراسة (٣٣)،و بينت الباحثة (٢٧) في دراسة اجريت في العراق بأن نسبة وجود هذا الجين في عزلات جراثيم *P.aeruginosa* شكلت (٨٠,٧%).

يشفر الجين التركيبي *S exo* للإنزيم الخارجي S والذي يوجد بصورة طبيعية على كروموسوم جرثومة *P. aeruginosa* ويتألف بصورة أساسية من جزئين أحدهما ذو الوزن الجزيئي ٥٣ كيلو دالتون والاخر ذو الوزن الجزيئي ٤٩ كيلو دالتون وإن إنتاج الجزء ذو الوزن الجزيئي ٤٩ كيلو دالتون يكون ضروريا للسمية بسبب احتواء هذا الجزء على الفعالية الانزيمية activity Ribosylating–ADP ٣٦)) ، ينتج هذا الانزيم في ٤٠% من العزلات السريرية وخصوصا العينات السريرية المعزولة منها جراثيم *P. aeruginosa* وله اهمية كبيرة في تحفيز الخلايا احادية النواة Monocytes على انتاج السايتوكاينيز والكيموكاينيز و الارتباط بمستقبلات خاصة على هذه الخلايا (٢٣) .



صورة(١) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR لـDNA عزلات جراثيم *P.aeruginosa* للكشف عن

الجين (*exoS*)باستخدام هلام الاكاروز (٠,٨%) تحت فرق جهد (٧٥) فولت لمدة(ساعة و١٥ دقيقة) .
المسار L الدليل الحجمي (١٠٠bp DNA ladder).
المسار C السيطرة السالبة (Negative control).
المسار(١) ناتج التضخيم لـ DNAجراثيم *P.aeruginosa* المعزولة من عينات الأذن
المسار(٤-٢) ناتج التضخيم لـ DNAجراثيم *P.aeruginosa* المعزولة من عينات الإدرار.
المسار(٨-٥) ناتج التضخيم لـDNAجراثيم *P.aeruginosa* المعزولة من عينات الجروح.
المسار(١٨-٩) ناتج التضخيم لـ DNAجراثيم *P.aeruginosa* المعزولة من عينات الحروق.

المصـــادر

-١إسماعيل ،جميلة راضي ؛ المحنة، بلسم ميري ؛مهدي ، سجى . (٢٠٠٩) . دراسة بكتريولوجية لجرثومة الزوائف الزنجارية *aeruginosa Pseudomonas* المعزولة من بعض الحالات المرضية في مستشفى الديوانية التعليمي ومستشفى النسائية والاطفال واختبار حساسيته لبعض المضادات الحياتية .المجلة الطبية البيطرية العراقية ،المجلد ٣٣ العدد ٣٣,٢ .

-٢بلال ،الهام جواد كاظم . (٢٠١٠) . التحري عن انزيمات البيتالاكتاميز في العزلات السريرية في بكتريا الزوائف الزنجارية في مدينة النجف . رسالة ماجستير، كلية التربية للبنات ،جامعة الكوفة.

-٣الجميلي ، زهراء عايد احمد .(٢٠١٤) . دراسة مقارنة لمقاومة المضادات الحيوية لبعض الجراثيم السالبة لملون كرام المعزولة من نماذج سريرية مختلفة في مدينة كركوك . رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة كركوك.

-٤ خورشيد ، محمد بهرام .(٢٠١٦). التحري عن تاثير بعض المواد على الجراثيم المقاومة للمضادات الحيوية والمعزولة من اخماج الحروق في مستشفى آزادي التعليمي في مدينة كركوك. رسالة ماجستير ، كلية العلوم ،جامعة كركوك.

-٥ العادلي، زينب فالح داخل. (٢٠١٦). التحري عن بعض الجينات المقاومة للامينوكلايكوسيدات والكينولونات في بكتريا *aeruginosa Pseudomonas* المعزولة من مصادر سريرية مختلفة في مدينة الديوانية . رسالة ماجستير،كلية العلوم ،جامعة القادسية .

-٦عريبي ، سناء مهدي. (٢٠١٠). مقاومة جرثومة *aeruginosa Pseudomonas* المعزولة من نماذج سريرية مختلفة لبعض المضادات الحيوية . مجلة علوم\ ذي قار . المجلد (٢) العدد (٣) .

-٧محسن ، مسلم عيدان .(٢٠١٠). دراسة تأثير الفوسفات في ضراوة بكتريا الزوائف الزنجارية خارج وداخل الجسم الحي . رسالة ماجستير، كلية العلوم ، جامعة الكوفة .

-٨النعيمي،علا عبد الكريم كاظم. (٢٠١٥). دراسة تأثير البروبايوتك في تكوين الغشاء الحيوي وانتاج أنزيم البروتيز لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من أخماج الحروق والجروح ، رسالة ماجستير،كلية التربية الأساسية ،جامعة المستنصرية .

-٩النيساني ، علياء لطيف سلمان .(٢٠١١) . دراسة بعض عوامل ضراوة بكتريا *P.aeruginosa* باستخدام بعض المؤشرات الوراثية . رسالة ماجستير ،كلية العلوم، جامعة تكريت .

-١٠AL -Niaame ،A. E.; AL -Marjani ،M. F. and ABD, S.Y. (2013) . Detection of ESBL And AmpC β-Lactamase In Gram Negative Isolates from some Iraqi Medical Centers in Baghdad . Int. J .Adv Res, 1 (7), 600-9.

11-AL-Dulami ,H.F.L.(2017). Assessment The Effect of Quorum Sensing genes (*lasI* ,*rhlI*) and some Plant Extracts on Some Virulence Factors of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Different Clinical Sources. M.Sc. Thesis .College of Science .Anbar University.

12-AL-Fatlawi,A.F. (2012). Detection of some Extended Spectrum Beta Lactamases Genes in *Escherchia Coli* and *Klebsiella spp.*Isolated from Colon and Bladder Cancer Patients in AL-Diwania City. M.Sc. Thesis. College of Medicine, AL-Qadisiya University.

13-Alfred, E.B.(2005). Benson's Microbiological Applications Laboratory Manuals in General Microbiology .9th ed , McGraw-Hill Companies.

14-Al-Marjani, M.F. ; Kadhim, K.A. ; Kadhim, A.A. and Kinani, A.Y. (2015) . Ciprofloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients in Baghdad .Inter. J. Pharma Sci. Res,6(2), 382-391 .

15-Al-Musawi , D.K.M . (2014) . Correlation of Quorum Sensing Genes with Some Virulence Factors in *Pseudomonas aeruginosa* . M.Sc. thesis . College of Science . Al- Mustansiriyah University .

16-AL-Tikrity, I. A. L. (2009).Bacteriological and Genetical study of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from different human infection M.Sc. Thesis. College of Science .Tikrit University.

17-Benson, H.J (2002). Microbiological Application Laboratory Manual in General Microbiology. 8th ed. McGraw-Hill.. USA.,P:196,436,185-188.

18-Breidenstein, E.B.M. ; Fuente-Nunez, C.I. and Hancock, R.E.W. (2011) . *Pseudomonas aeruginosa* : all roads lead to resistance . Trends in Microbiology, 19(8), 419-426 .

19-Brown, A.E(2007).Benson's Microbiological Applications Laboratory Manual in General Microbiology.10th ed .McGraw-Hill Comp.Inc., U S A. :102-263.

20-Christensen, G.D.;.Simpson, W.A ; .(١٩٨٢Bismo, A.C.and Beachery ,E.H(to smooth *Staphylococcus epidermidis* in ofproducing sta-Adherence of slime ٣٢٦,-٣١٨ ،(١)٣٧J. Infec and Imm, .surface

21-CLSI, (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2016). Performance standard for antimicrobial susceptibility testing; Twenty- SIX informational supplement.

22-Cox, G. ; Stogios, P.J. ; Savchenko, A. and Wright, G.D. (2015) . Strutural and molecular basis for resistance to aminoglycoside antibiotics by the adenyl transferase ANT(2")-Ia. Mbio, 6(1): 2180-2194 .

23-Epelman, S. ; Danuta, S. ; Chris, B. and Erica, W. (2004). Different Domains of *Pseudomonas aeruginosa* Exoenzyme S Activate Distinct TLRs1. *Journal of Immunology*, 173(3) ,2031-2040.

24-Forbes,B.A . ;Bailey and Scott's .(٢٠٠٧)Sahm, D.F. and Weissfeld, A.S. ١٦٧,-١٦٦St. Louis. USA.: .ed. Mosby. Inco th١٢Diagnostic Microbiology .

25-Fraylick, J. E.; La Rocque, J. R.; Vincent, T. S. and Olson, J. C. (2001). Independent and coordinate effects of ADP-ribosyl transferase and GTPase-

activating activities of exoenzyme S on HT-29 epithelial cell function. *Journal of Infection and Immunity*,69(9), 5318-5323.

26-Fraylick, J. E.; La Rocque, J. R.; Vincent, T. S. and Olson, J. C. (2001). Independent and coordinate effects of ADP-ribosyl transferase and GTPase-activating activities of exoenzyme S on HT-29 epithelial cell function. J. Infec and Imm,69(9), 5318-5323.

27-Garallah ,E .T.(2015). Molecular analysis of some virulence genes of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis and non cysticfibrosis sources. M.Cs.Thesis,College of Science .AL- Mustansiriyah University.

28-Goli,H.R.; Nahaei,M.R.; Rezaee,M.A.; Hasani,A.; Kafil,H.S.and Aghazadeh , M.(2016).Emergence of colistin resistant *Pseudomonas aeruginosa* at Tabriz hospital ,Iran . Iranian J. Micro, 8(1), 62-9.

29-Haleem, H. ; Tarrad, J.K. and Banyan, I.A. (2011) . Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical cases and environmental samples and analysis of its antibiotic resistant spectrum at hilla teaching hospital . Med. J .Babylon, 8(4), 618-624 .

30-Kamel, G. M. ; Ezz eldeen, N. A. ; El-Mishad, M. Y. and Ezzat, R, F.(2011). Susceptibility Pattern of *Pseudomonas aeruginosa* Against Antimicrobial Agents and Some Plant Extracts with Focus on its Prevalence in Different Sources. Global Veterinaria , 6(1), 61 -72.

31-Kayser, F.H. ; Bienz, K.A. ; Eckert, J. and Zinkernagel, R.M. (2005) . Medical Microbiology . 9th ed. Thieme Stuttgart . New York .

32-Khan, S.; Naz, R.; Girotra, R. and Malik, A. K. (2016). Prevalence and Antibiogram of *Pseudomonas aeruginosa* in a Tertiary Care Hospital of Haryana .

33-Khosravi, A. D.; Shafie, F.; Montazeri, E. A. and Rostami, S. (2016). The frequency of genes encoding exotoxin A and exoenzyme S in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients. Burns, 42(5), 1116-1120 .

34-Kiffer , C. ; Husiung , A . ; Oplustil , C. ; Sampaio , J. ; Sakagami ,E.; Turner ,P.and Mendes ,C. (2005). Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospital: the MYSTIC program Brazil 2003. Brazil. J. Infe Dis, 9(3), 216 - 224.

35-Koneman, E.W .;.Allen,S.D ;.Janda, W.M ;Schreckenberger, P.C. and Winn, W.C.J. (٢٠٠٦)٦th Color Atlas and Text book of Diagnostic Microbiology. .ed. Lippincott William and Wilkins. Philadelphia .USA

36-Kulich, S.M.; Frank,D.W. and Barbieri,J.T.(1993). Purification and characterization of exoenzyme S from *Pseudomonas aeruginosa* Infect Immun 61:307-313.

37-Lambert, P.A. (2005) . Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites . Adv. Dru. Deliv. Rev. 29(57): 1471-1485 .

38-Lister, P.D. ; Wolter, D.J. and Hanson, N.D. (2009) . Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* : clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms . Clinical Microbiology Reviews . 22(4): 582-610 .

39-Macia, M. D. and Oliver, A.(2007) . Increased susceptibility to Colistin in Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* strains from chronic respiratory infections . Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 51(12):4531-4532.

40-Mitov, I.; Strateva, T. and Markova, B. (2010).Prevalence of virulence genes among Bulgarian nosocomial and cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(3),588-595.

41-Mohammed ,H.A.(2014).Immunological and Pathological effects of Pyocyanin extracted from *Pseudomonas aeruginosa.*Thesis of Master. College of Science University of Baghdad .

42-Murray, P. R. ; Baron, E. J. ; Jorgensen, J. H. ; Landry, M. L. and Faller, M. A. (2007) . Manual of clinical microbiology . 9th. ed. 770-803 . American Society Of Microbiology . Washington, USA .

43-Murray, P. R. ; Baron, F. J. ; Pfaller, M. A. ; Tenover, F. C. and Yolken, R. H. (2003) ."Manual of clinical microbiology". 8th ed. p:719-728.

44-Nichols, D. P.; Caceres, S.; Caverly, L.; Fratelli, C.; Kim, S. H.; Malcolm, K. and Moskowitz, S. (2013). Effects of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infection. J.surg. res, 183(2), 767-776.

45-Niveditha, S.;The Isolation and The .(٢٠١٢)Pramodhini,S.and Umadevi, S . Biofilm Formation of Uropathogenes in The Patients With Catheter Associated Urinary Tract Infections(UTIs). J. Clin and Diag. Res, (٩)٦ ، ١٤٧٨-١٤٢٨.

46-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: 851-856.

47-Poole, K.(2000). Efflux –mediated resistance to floroquinolones in gram-negative bacteria .A.A.C.44(9)2233-2241.

48-Prescott, H. (2002). Laboratory Exercises in Microbiology. 5th ed. The Mcgraw-Hill.French.

49-Rajat, R. M.; Ninama, G. L.; Mistry, K.; Parmar, R.; Patel, K. and Vegad, M. M. (2012). Antibiotic resistance pattern in *Pseudomonas aeruginosa* species isolated at a tertiary care hospital, Ahmadabad. Natl J. Med Res, 2(2), 156-159.

50-Schraidt, O.; Lefebre, M.D.; Brunner, M.J.; Schmied, W.H.; Schmidt, A. (2010).Topology and Organization of the Salmonella typhimurium Type III Secretion Needle Complex Components. PLoS Pathog 6(4): e1000824.

51-Senturk, S. ; Ulusoy, S. ; Bosgeimez- Tinaz, G. and Yagci, A. (2012). Quorum sensing and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during urinary tract infection. J. Infection Devctries . 6 (6): 501-507.

52-Sharma,S. ;Kaur, R. ;Yadav ,V. ;Harjai ,K. and Joshi , K. (2004) . Contribution of exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* in acute and chronic experimental renal infection. Jpn. J. Infect. Dis. 57: 119-120 .

53-Singh, P. and Tolpadi, A. (2018). Antibiotic Susceptibility Profile and Detection of Metallo-Betalactamase in *Pseudomonas aeruginosa* isolates From Clinical Specimens in a Tertiary Care Hospital .Indian J. App. Res, 8(2).

54-Somayeh ,M . G and Fereshteh, E.(2013). Assessment of Carbapenem Susceptibility and Multidrug-Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Burn Isolate in Tahran . Jundishapur J. Microb,6(2) ,162-165.

55-Steve, K.;Laboratory Exercises in Organismal .(٢٠٠٤Dennis, S. and Mary, J.(. and Molecular Microbiology .ASM. Washington. USA

56-Tingpej, P.; Smith, L.; Rose, B.; Zhu, H.; Conibear, T.; Al Nassafi, K.and Bell, S. (2007). Phenotypic characterization of clonal and nonclonal *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from lungs of adults with cystic fibrosis. *Journal of clinical microbiology*, 45(6), 1697-1704.

57-Wei, Q. and Ma, L. Z. (2013). Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. Int J. molec. sci, 14(10), 20983-21005.

Detection of *exo S* gene and some Phenotypic virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* isolates clinically in Kirkuk city

Abstract :-

In this study, 25 isolates were isolated from *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*), which included (17) isolation (41.46%) of burns, (4) isolates (8.33%) of wound injuries,(3) isolates (5.35%) of urinary tract infections and (1)

isolation (2.85%) of ear infections. The bacterial isolates were resistant to the antibiotic Amoxicilin (100%). The isolates showed varying resistance to Ciprofloxacin, Aztreonam, Gentamicin, Imipenem (28%, 64% , 88%, 96%), respectively. While no antibiotic resistance was shown in Colistin (100%). The results of the phenotypic detection showed some virulence factors that all isolates produced capsule and protease by 100%, while 92% of these isolates produced beta-hemolysis enzymes and 80% of the isolates were produced biofilm. The results of detection of exo S gene using PCR technique showed that all isolates of the gene were found to be 100%.