P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703
2015 ,(9), (3) :144-155
مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة (JUAPS)
Open Access

دراسة التباين الجزيئي للعزلات المرضية لبكتريا الزوائف الزنجارية لجينات apH، flcB, lasB 16srRNA. الخاصة بالضراوة والصفات التشخيصية

احمد محمد يوسف* احمد محمد تركي** احمد عبد الجبار سليمان***

*وزارة الصحة – دائرة صحة الانبار

**جامعة الانبار – كلية العلوم

***جامعة الانبار / مركز دراسات الصحراء

معلومات البحث:

تاريخ التسليم: ٢٠١٣/٠٠/٠٠
تاريخ القبول: ٢٠١٤/٥/٦
تاريخ النشر: / / ٢٠٢٢

DOI: 10.37652/juaps.2015.127638

الكلمات المفتاحية:

PCR,
antibiotic resistance,
Pseudomonas aeruginosa .

الخلاصة:

تضمنت الدراسة الحالية جمع ٤٣٨ عينة سريرية من مستشفى الرمادي التعليمي العام و ٥٠ عينة من التربة خلال المدة الممتدة من تشرين الثاني ٢٠١٤ ولغاية أشباط ٢٠١٥ للتحري عن وجود بكتريا Pseudomonas aeruginosa وقسمت العينات حسب مصدر عزلها الى ٤٠ عينة من الحروق والجروح والأدرار ومن التهابات الأذن و ١٠ عينة من التربة. أجري فحص أختبار الحساسية لجميع العزلات البكتيرية المنتخبة والبالغ عددها ٥٠ عزلة أتجاه١٢ نوع من المضادات الحيوية Tobramycin, Chloromphicol, Penicillin, Cefotaxime, Amikacin، Naldixic, Amoxicilline, Tetracycline, Ampicillin, Vancomycin, acid، Ciprofloxcin, Streptomycin بطريقة الأنتشار على الأطباق وكانت جميع العزلات المنتخبة من الحالات المرضية مقاومة لثلاثة أنواع من هذه المضادات وبنسبة ١٠٠% وهي Amoxicilline, Ampicillin, Penicillin في حين تباينت هذه العزلات في مقاومتها لبقية المضادات الحيوية. كما أبدت العزلات المنتخبة من التربة حساسية عالية أتجاه جميع هذه المضادات وبنسبة ١٠٠% ماعدا مضادين Penicillin, Ampicillin وبنسبة ٦٠% و ٧٠% على التوالي.ولغرض دراسة النسق الجيني لهذه العزلات تم أستخلاص الـ DNA من العزلات البكتيرية المنتخبة والبالغة ٥٠ عزلة وتم أستخدام هذا الـ DNA المستخلص في تقنية تفاعل البلمرة المتسلسلة بأستخدام اربع جينات من جينات عوامل الضراوة والجينات التشخيصية لهذه العزلات البكتيرية بأستخدام البادئات apH, flcB, lasB، 16srRNA أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي في هلام الاگاروز أمتلاك جميع عزلات بكتريا Pseudomonas aeruginosa على جينات عوامل الضراوة والجينات التشخيصية العائدة لها، والمسؤولة عوامل الضراوة في كل نوع من هذه البكتريا، وأظهرت نتائج السكونس تطابق نتائج التشخيص لهذه العزلات.

المقدمة

تعد بكتريا الزوائف الزنجارية من العصيات السالبة لملونة گرام منتظمة بشكل خلايا مفردة أو سلاسل قصيرة أو على شكل عصيات مستقيمة أو منحنية تتحرك بواسطة سوط واحد قطبي أو سوطين في بعض الأحيان وقد تكون غير قطبية وتستخدم هذه الصفة في تشخيصها ومن أهم المرضات التي تنتشر بصورة واسعة في البيئة فهي توجد كل مكان في التربة والمياة وعلى السطوح وعلى هيئة فلورا طبيعية في جسم الأنسان والحيوان ويمكن لهذا النوع أن يسبب المرض للنباتات والحشرات والأسماك والزواحف والطيور والثديات(١). كما تعد هذه البكتريا ذات مدى واسع وقدرة عالية في أحداث الاصابة من خلال كونها ذات أمراضية متعددة ومتغايرة ومعتمدة على عدد واسع من محددات الضراوة

* Corresponding author at: Ministry of Health - Anbar Health Department E-mail address:

التي تعطيها القدرة على أستعمار طائفة واسعة كل هذا متأتي من قدرتها على التنوع الأيضي مسببة بذلك الأمراض المختلفة في المستشفيات (٢). طورت هذه البكتريا قدرتها على مقاومة العديد من المضادات الحيوية الشائعة بشكل غير متوقع من خلال أحداث تغيرات وراثية في تركيبها وهذا التطور الوراثي في قدرة هذه البكتريا جاء من خلال الاستخدام العشوائي للمضادات الحيوية (٣) أضافة الى أمتلاك هذه البكتريا العديد من عوامل الضراوة والتي ساعدتها في مقاومة مختلف الظروف من خلال استخدام العديد من المواد كمتطلبات غذائية في نموها وتكاثرها وهذا مايزيد من احتمالية الإصابة بها وبخاصة أذا ما ضعفت أو أنعدمت الوسائل الوقائية المناسبة واللازمة لهؤلاء المرضى داخل المستشفى وتعتمد قابليتها في غزو الأنسجة على مقاومتها لعملية البلعمة (٤). وبعد ظهور تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل أزداد الأهتمام بهذه البكتريا بشكل ملحوظ في السنوات الأخيرة لما تمتلكه من أهمية طبية من خلال الدخول في دراسة عوامل الضراوة التي تمتلكها هذه البكتريا والجينات المسؤولة عنها هذه العوامل أضافة الى الطفرات التي تحدث فيها، وتعتبر الأسواط والأهداب أهم عوامل الضراوة من خلال دورها في أحداث الأصابة والأستيطان في خلايا المضيف أضافة الى مقاومة عملية البلعمة والأستجابة المناعية كما أنها تمتلك عوامل مهمة أخرى مثل Protases, Phospholipases, Exotoxic والصبغات التي تساهم بدور مهم في عملية أحداث الأصابة وهذه بدورها تكون متأتية بعد الأسواط والأهداب (٥). أستخدمت التقنيات الجزيئية بشكل كبير ومهم في تشخيص هذه البكتريا والتعرف على السلالات المقاومة والطافرة لما تتميز به هذه التقنية من دقة وحساسية عالية أضافة الى أنها تعطي أفضلية للتشخيص وأكتشاف الجينات التي تكون مقاومة للمضادات الحيوية أو المسؤولة عن أحداث الأصابة (٦). أشارت العديد من البحوث والدراسات في السنوات الأخيرة الى أن هذه البكتريا تمتلك المئات من الجينات والأوبرينات التي تساهم في ظهور السلالات المقاومة للمضادات الحيوية والتي تسبب الأصابة للعديد من المرضى وبتطور التقنيات الجزيئية تم الكشف عن هذه الجينات والتغايرات الوراثية والمظهرية في هذه البكتريا.

المواد وطرائق العمل

- جمع العينات : تم جمع (٤٣٨) عينة من حالات مرضية مختلفة شملت (الإدرار، الحروق، الجروح، التهابات الإذن) من مستشفى الرمادي التعليمي العام وللفترة من تشرين الاول ٢٠١٤ ولغاية شهر شباط ٢٠١٥ وتم جمع (٥٠) عينة من التربة شملت مواقع مختلفة.
- تشخيص العزلات البكتيرية المنتخبة identification of isolates.
- أجريت الفحوصات المجهرية والكيموحيوية اعتماد على المصادر العلمية المتبعة عالميا لتشخيص البكتريا (٧ و٨) اضافة الى استخدام نظام (أبي ٢٠ للعائلة المعوية API 20) واخير تم استخدام التشخيص الكيموحيوي باستخدام جهاز Vitek 2 system.
- اختبار حساسية المضادات الحياتية: أُجري اختبار مقاومة المضادات الحياتية بطريقة الأقراص وحسب ما مذكور (٩) للتعرف على مدى حساسية العزلات البكتيرية التي هي قيد الدراسة للمضادات الحياتية باستخدام مجموعة من أقراص المضادات الحياتية المجهزة من قبل شركةoxoid البريطانية.

٤- استخلاص وتنقية الدنا الجينومي Extraction and purification of genomic DNA

استخلصت عينات دنا الجينومي للعزلات البكتيرية البالغ عددها ٥٠عزلة بكتيرية باستخدام عدة استخلاص الدنا الجينومي للبكتريا المنتج من شركةGeneaid ذي الرقم التسلسلي GBB101.

تفاعلات الـ PCR (تقنية التفاعل التسلسلي لأنزيم البلمرة ال DNA)

أ- المحاليل المستخدمة في تفاعلات ال PCR

١- البادئات Primers

يبين الجدول (١) البادئات النوعية والتي تم تصميمها بشكل خاص لهذه الدراسة والتي تستهدف جينات الهدف (pvdE,phzM, toxA, 16srRNA) وفقاً لما ذكر (١٠) والتي جُهزت بشكل مسحوق مجفد (Lyophilized) من شركة (BIONEER)، وقد تمت إعادة تذويبها بحجم من الماء المقطر والمعقم بحسب توصيات الشركة للحصول على محلول خزين لكل بادئ بتركيز (Pmol/µl١٠٠) ثم حفظ هذا المحلول الخزين بدرجة حرارة -٢٠ مْ.

جدول (١) البادئات المستخدمة في تفاعل البلمرة المتسلسل

اسم البادئ	تسلسل القواعد 3→5	حجم ألجين المستهدف bp
phzM-F	ACGATCATGC GGGTTTCCAT	454
phzM–R	GCGAATTGAC CAAGGCCATC	
toxA–F	TTCCCAGGTA TCGTCGAGGT	297
toxA–R	GGTAACCAGC TCAGCCACAT	
16srRNA-F	GAGAGAGGG CAACTCGCTAC	188
16srNA-R	ACAACCTGCT GGACTATCGC	
pvdE-F	TCACTGGCTT CGTGATGGTC	288
pvdE-R	CGATGTCACC TTGGGCGATA	

phzM البرايمر الخاص بصبغة البايوسيانين، toxA البرايمر الخاص بصبغة الـذيفانات الخارجيـة، 16srRNA البرايمـر المسـتخدم كجـين تشخيصـي، pvdE البرايمر الخاص بصبغة البايوفردين.

٢- محلول Robust Hotstart Ready mix :

استخدم هذا المحلول المجهز من قبل شركة (Kapa) بقوة (2X) المتكون من المحلول المنظم لعمل أنزيم البلمرة PCR buffer والنيوكليدات منقوصة الأوكسجين dNTPs وأنزيم بلمرة الدنا Taq DNA.

٣- الدليل ألحجمي Marker :

استعمل دليل الدنا ألحجمي DNA Lader بحجم (100 Pb) زوج قاعدي والدليل 1Kbp والمجهز من شركة (Kapa) إذ تم استعماله كمؤشر لحجم قطع الدنا التي يمكن إن تظهر بعد إجراء تضاعف البلمرة المتسلسل (PCR) حيث في البداية تم ترحيل الدنا الجينومي على هلام الاكاروز مع استخدام الدليل ألحجمي 1Kbp للتأكد من وجود الدنا لكل من العينات المستخدمة.

أ- التحري عن الجينات الضراوة باستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل :

حضر مزيج التفاعل الرئيسي غير الحاوي على DNA المستخلص من العزلات البكتيرية لعمل تفاعلات الـPCR تحت ظروف معقمة لكل جين من جينات الضراوة المستخدمة(toxA، 16rRNA، phzM، pvdE) وكل واحد من هذه الجينات على حدا. وتم تحضير مزيج التفاعل ٥٠ عينة DNA من هذه البكتريا بالاضافة الى ذلك تم اضافة عينة سيطرة سالبة لها مع البادئات التي من المفترض ان تعطي نتيجة سالبة لهذا النوع البكتيري ليصبح عدد العينات الكلية ٥١ عينة ثم وزع محلول التفاعل الرئيسي على انابيب ابندروف سعة ٠.٢ ملتر وبحجم ٢٢ مايكروليتر لكل عينة بعدها اضيف الى كل انبوبة ٣ مايكروليتر من DNA الخاص بكل عينة ليصبح الحجم النهائي ٢٥ مايكروليتر باستثناء السيطرة لا يضاف لها DNA. بعدها ادخلت في جهاز المبلمر الحراري باستعمال البرنامج المناسب وكما مبين في جدول (٢). ثم بعد ذلك حمل في هلام الاكاروز والمحضر بتركيز ١.٥% للكشف عن وجود الجينات.

أنتخب على ضوء نتائج تفاعل البلمرة التسلسلي للجينات ثم أنتخبت عزلة واحدة من كل جين وأرسلت الى أختبار Sequence لمعرفة تتابع القواعد النتروجينية لكل جين.

جدول رقم (٢) برنامج جهاز المبلمر الحراري الخاص بمزيج تفاعل الـ PCR للبادئات المستخدمة

الخطوات الرئيسية	عدد الدورات	الزمن	درجة الحرارة (م)
المسخ الأولي للـ DNA	1	5 min.	95
مسخ DNA القالب	——	45 Se.	93
ارتباط البادئ في DNA القالب	30	30 Se.	58 حسب نوع البادئ المستخدم
أستطالة البايات المرتبطة	1	7 min.	72
الأستطالة النهائية	1	7 min.	72

النتائج والمناقشة

١- العزل والتشخيص

بعد اجراء الفحوصات الكيموحيوية للعزلات البكتيرية المعزولة من مستشفى الرمادي التعليمي تم تشخيص ٤٠ نوع من البكتريا المرضية و ١٠ انواع من البكتريا المعزولة من التربة وذلك اعتمادا على الصفات المزرعية والمجهرية والكيموحيوية وباستخدام ApiE20 وكذلك استخدام جهاز الـ Vitek2. اذ اظهر الفحص المجهري والتصبيغ بصبغة كرام بانها عصيات سالبة لصبغة كرام تنتظم بشكل سلاسل قصيرة غير مكونة للأبواغ ولا تمتلك كبسولة كما أستخدم نظام Api–20 E لزيادة التأكيد لتشخيص هذه البكتريا، أذ يعد هذا النظام من الاختبارات الكيموحيوية المهمة لتشخيص العائلة المعوية وبكتريا Pseudomonas وظهرت أن جميع العزلات المدروسة تعود إلى بكتريا Pseudomonas aeruginosa عند مقارنة النتائج مع الدليل الخاص بهذا النظام. ولتأكيد هذا التشخيص بشكل نهائي وقاطع للعزلات

البكتيرية المدروسة تم أستخدام جهاز الفايتك وظهرت أن هذه العزلات تعود إلى بكتريا الزوائف الزنجارية وبنسبة تشخيص٩٤–٩٨% وبحسب نوع العزلة، ويعد هذا التشخيص ممتازاً وأستناداً الى نتائج التشخيص الزرعي والمجهري والاختبارات الكيموحيوية وأستخدام نظام Api – 20 E وأستخدام جهاز الفايتك حصلنا على ٥٠ عزلة تعود إلى بكتريا Pseudomonas aeruginosa وبشكل تشخيصي غير قابل للشك لذا فقد ظهرت في هذه الدراسة التي تم عزل هذه البكتريا من مصادر مختلفة سواء كانت حالات مرضية أو تربة تشابه في سلوكها اتجاه الاختبارات المظهرية والزرعية والكيموحيوية المستخدمة في تشخيص هذه البكتريا

– أختبار حساسية العزلات البكتيرية لبكتريا *Ps. aeruginosa* للمضادات الحيوية :

أجري أختبار حساسية عزلات بكتريا ***Pseudomona aeruginosa*** للمضادات الحيوية بطريقة الأنتشار حول الأقراص (كاربي– باور) في تحديد مدى حساسية أو مقاومة هذه العزلات البكتيرية أتجاه ١٢ نوع من المضادات الحيوية أعتماداً على قطر التثبيط للمنطقة المحيطة بأقراص المضادات ومقارنتها بأقطار التثبيط القياسية الواردة في (CLSI 2013) أذ يوضح جدول (٣) العدد الكلي للعزلات البكتيرية المختبرة وعدد العزلات البكتيرية الحساسة والمقاومة والمتوسطة للمضادات الحيوية قيد الدراسة.

أوضحت النتائج أن معظم العزلات البكتيرية كانت مقاومة لأغلب المضادات الحيوية وهي نسبة مرتفعة للمقاومة وتكون متوقعة بالنسبة للعزلات المأخوذة من الحالات المرضية وهذا يكون متأتي من الأستخدام العشوائي والمفرط للمضادات الحيوية وبدون أستشارة طبية فضلاً عن أمكانية أمتلاك هذه العزلات البكتيرية الى آليات المقاومة المختلفة وتطويرها لهذه الآليات ضد أغلب المضادات الحيوية المستخدمة في العلاج (١١) على العكس من ذلك نجد أن العزلات التي عزلت من التربة قد أبدت حساسية عالية أتجاه المضادلات الحيوية المستخدمة في الدراسة عكس العزلات المرضية، لذا كان الهدف من أجراء أختبار الحساسية والمقاومة للعزلات لمعرفة مدى تأثير هذه المضادات للعزلات البكتيرية بالمقارنة بالعزلات المستحصل عليها من التربة.

جدول (٣) تأثير المضادات الحيوية المختلفة أتجاه بكتريا *Pseudomona aeruginosa*

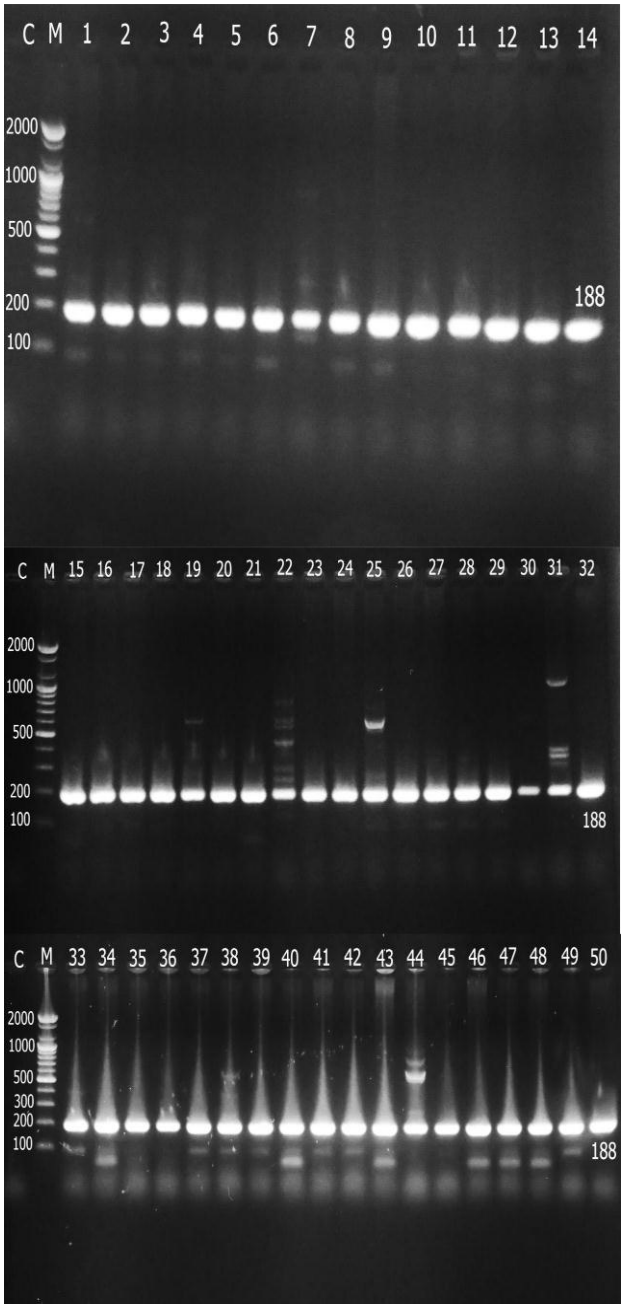
ت		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
أسم المضاد		Tobromycin	Chloromphicol	Amikacin	Cefotaxime	Penicillin	Ampicillin	Tetracycline	Amoxicillin	Naldixic acid	Vancomycin	Streptomycin
موقع العزلات	العدد											
الجروح	10	R 1	9	2	8	10	10	10	10	10	3	8
		I 2	1	3	2	0	0	0	0	0	2	2
		S 7	0	5	0	0	0	0	0	0	5	0
مسحات الأذن	10	R 1	8	3	10	10	10	10	10	10	4	7
		I 2	2	2	0	0	0	0	0	0	2	0
		S 7	0	5	0	0	0	0	0	0	4	0
الأدرار	10	R 2	4	1	9	10	10	10	10	8	3	6
		I 0	4	1	0	0	0	0	0	2	1	0
		S 8	2	8	1	0	0	0	0	0	6	0
الحروق	10	R 3	6	2	7	10	8	10	5	10	4	7
		I 0	2	2	2	0	2	10	5	0	2	3
		S 7	2	6	1	0	0	0	0	0	4	0
التربة	10	R 0	0	0	0	4	3	0	0	0	0	0
		I 0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
		S 10	10	9	10	5	6	10	10	10	10	10

12	Ciprofloxcin	3	3	4	3	2	5	3	1	6	4	1	5	0	0	10	

S: Sensitive I: Intermediate R: Resistance.

– الكشف عن جين16srRNA لبكتريا *Pseudomona aeruginosa* :

تم أجراء اختبار التفاعل التضاعفي لسلسلة الـ DNA باستخدام البادئ المستخدم للجين 16srRNA 188 bp الذي يقع في المنطقة الكروموسومية، اذ ان هذا الجين يؤكد تشخيص هذه البكتريا التي تعود الية وبعد أجراء تفاعل **PCR** وترحيل نتائج هذا التفاعل على هلام الآگاروز بتركيز ١.٥% وفحصه بالأشعة فوق البنفسجية ظهرت حزم ذات حجم جزيئي 188 زوجاً قاعدياً للعزلات البكتيرية الخمسين مما يعني وجود الجين المستهدف لهذه العزلات صورة (١). في حين ظهرت العزلات التي تحتوي الأرقام (٢٥، ٣١، ٤٤) تحمل أكثر من نسخة لهذا الجين مما يؤكد نتائج التشخيص بالطرق الأعتيادية المظهرية مع الطرق الجينية من أن هذه العزلات تعود الى بكتريا ***Pseudomona aeruginosa***. ومن خلال النتائج وجد أن صفة هذا ألجين هي صفة سائدة في كل سلالات بكتريا الزوائف الزنجارية مما يعني أن هذا البكتريا تمتلك الجين الحامل للشفرة الوراثية الخاصة لصفة تشخيص هذه البكتريا 16srRNA وبذلك تشير هذه النتائج إلى أن هذا ألجين يعد جيناً تشخيصياً لهذه البكتريا من خلال تطابق نتائجه مع نتائج الفحوصات الروتينية التشخيصية وبذلك يتم الاستغناء عنها واستخدام هذا ألجين في تشخيص هذه البكتريا توفيراً للوقت والجهد والدقة العالية المتحصل عليها في تشخيص هذه البكتريا، إذ يعد التشخيص الجزيئي للعزلات البكتيرية مهماً وذو نتائج وحساسية دقيقة جداً في مجال التشخيص، إذ أن التشخيص عن طريق الاختبارات الكيموحيوية يمكن من خلالها الحصول على نتائج ايجابية كاذبة لهذا وجهت الدراسة الحالية إلى استخدام الاختبارات الجزيئية من خلال التضخيم الجزيئي لجين 16srRNA ونتائجنا هذه جاءت متوافقة مع ما جاء به (٥) حيث وجد ان جميع العينات المدروسة تحتوي ألجين 16s rRNA ومن خلال ما تقدم يعد التشخيص الجزيئي باستخدام16srRNA مثالياً ويعطي نتائج دقيقة جداً لتشخيص العزلات البكتيرية إضافة إلى الاختصار في الوقت الجهد الذي تتطلبه عملية التشخيص الاعتيادي، اذ توجد هناك ثلاثة جينات رايبوسومية16srRNA، 23srRNA، 5srRNA يعد جين 16S rRNA تاريخياً هو الأكثر استخداماً لغرض التشخيص وذلك لقدرته العالية على أمتلاك عدد من النسخ الجينية المعتدلة التي تعود الى الجنس البكتيري الذي يمتلكه اذ تم العثور على جميع هذه الجينات في جميع أنواع البكتريا حتى المتعرضة منها للطفرات وذلك لأن جين 16srRNA يحتوي على بروتينات فريدة من نوعها تعطي معلومات أو إرشادات عن أي بكتريا تحتويها والتي تسهل في النهاية تشخيص هذه الأجناس البكتيرية العائدة لها.



صورة (١) الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل البلمرة التسلسلية لسلسلة الـ DNA باستعمال البادئ 16s rRNA على وسط هلام الأگاروز بتركيز ١.٥ % M : الدليل الحجمي C،188 bp : معامل السيطرة السالبة، 50 – 1: أرقام العزلات لبكتريا *Ps. aeruginosa*.

ومن خلال النتائج التي ظهرت في الصورة (١) لمنطقة التشفير لجين 16s rRNAوحجم 188 زوج قاعدي تم إرسال عينة من منطقة التشفير لهذا ألجين ولعزلة بكتيرية من العزلات الخمسين.

وأظهرت نتائج تطابق في تسلسلات بعد أجراء المقارنة مع بنك المعلومات وبحسب الموقع www.ncbi.nlm.gov ضمن الرقم التعريفي reflnc002516.2 ونقطة نجاح 6264404 وبنسبة توقع صفر كما في الشكل (١).

وجاءت نتائج هذه الدراسة متطابقة مع نتائج التشخيص في استخدام الاختبارات الكيموحيوية واستخدامها Api20E واستخدام جهاز الفايتك في تشخيص هذه العزلات أذ أظهرت نتائج التشخيص الأولي لهذه العزلة بأستخدام التشخيص الجزيئي تطابق عالي بلغ تقريباً ٩٩%. أذ يعد التشخيص الجزيئي للعزلات البكتيرية مهم وذو حساسية عالية وذو نتائج دقيقة في مجال التشخيص أذ أن التشخيص عن طريق الأختبارات الكيموحيوية يمكن من خلاله الحصول على نتائج أيجابية كاذبة لهذا توجهنا في الدراسة الحالية الى أستخدام الأختبارات الجزيئية من خلال التضخيم الجزيئي لجين 16s rRNA ثم أستهدفت الى أجراء تحديد تباينات القواعد النتروجينية للقطع الناتجة من الجين التابع لبكتريا الزوائف الزنجارية، أذ وجدت هذه التتابعات تطابق جيني عالي لهذه العزلات المشخصة. أن وجود هذه العزلات المعزولة من مصادر مرضية مختلفة وتربة تعود الى بكتريا الزوائف الزنجارية بوساطة أستخدام التشخيص الجزيئي لجين 16srRNA نتائجنا هذه جاءت متوافقة مع ما وجده (12) في تشخيص بكتريا الزوائف الزنجارية المعزولة من الحالات المرضية بوساطة جين 16s rRNA. وان الحزم التي ظهرت في هذه الدراسة تمثل الجينات المشفرة لهذا الجين وهذه النتيجه تتوافق مع ما توصل الية (13) من ان وجود هذا الجين كان متطابقا جينيا مع العزلات المستخدمه في التشخيص،،في حين كانت نتائج دراسة (١٤) متوافقه مع نتائج الدراسة الحالية اذ وجد أن هذا الجين استخدم في تشخيص بكتريا الزوائف الزنجارية في حين شخص الباحث (١٥) ومن خلال ما تقدم نجد ان استخدام الجين 16s rRNA مثاليا من خلال التتابعات الخاصة به والتي اظهرت تطابقا في تسلسلاته واعطت نتائج دقيقة لهذا التشخيص من خلال قدرتها العالية على امتلاك نسخ جينية معتدلة تعود لهذا الجنس البكتيري والتي تسهل في النهاية تشخيص هذة البكتريا بدقة عالية واختصارا للوقت والجهد.

Pseudomonas aeruginosa chromosome, complete genome
Sequence ID: ref|NC_002516.2|Length: 6264404Number of Matches: 1
Features:
16S rRNA-processing protein RimM
Query 1
GAGAGAGGGCAACTCGCTACGCGGGATGCAGATCTCGTAACCG
GTGAAGGTGCGGGCCTC 60
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 4196405
GAGAGAGGGCAACTCGCTACGCGGGATGCAGATCTCGTAACCG
GTGAAGGTGCGGGCCTC 4196464

Query 61
TTCGCGATCGTCGAGCCCCTTGAGCTTGGCGGCCAGGACCTTGC
CATGCAGGCGCCCCCT 120
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 4196465
TTCGCGATCGTCGAGCCCCTTGAGCTTGGCGGCCAGGACCTTGC
CATGCAGGCGCCCCCT 4196524

Query 121
GACCAGCTCGGCCTGCCGAATCTCGCCGTCGCGCCGGAGCGTCC
AGCGGCGATAG 175
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 4196525
GACCAGCTCGGCCTGCCGAATCTCGCCGTCGCGCCGGAGCGTCC
AGCGGCGATAG 4196579

شكل (١) تسلسلات القواعد النيتروجينية للجين 16SrRNA

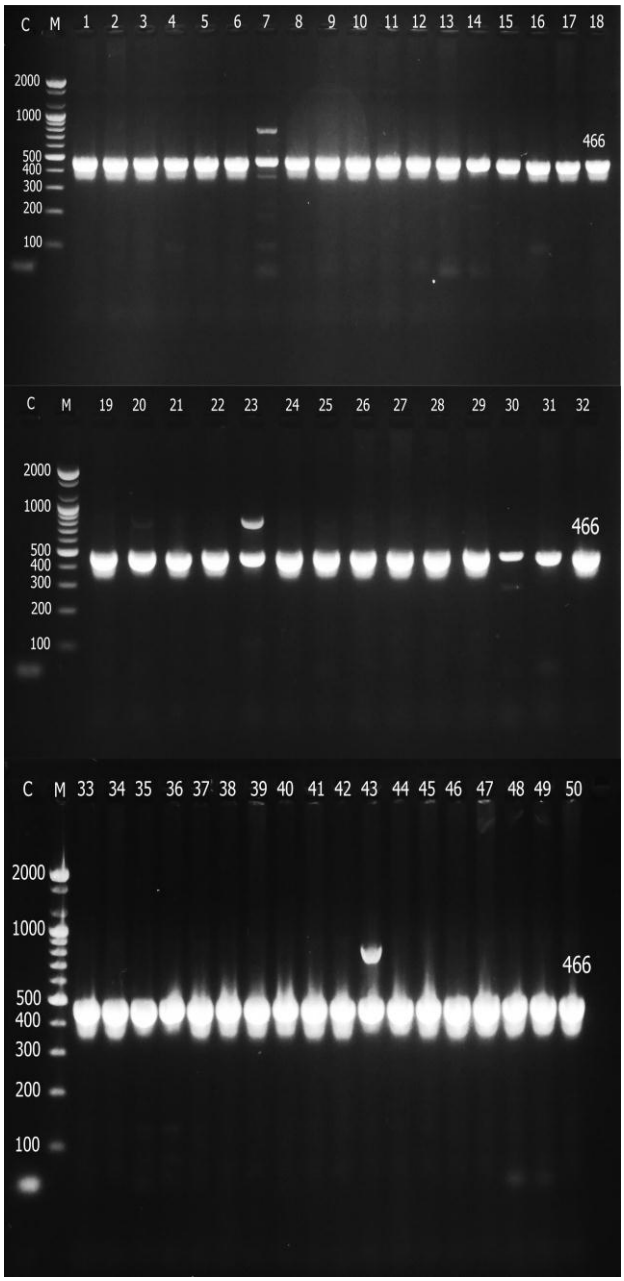
– الكشف عن الجين المسؤول عن أنزيم البروتيز القاعدي في بكتريا *Pseudomona aeruginosa* :

في هذه الدراسة ومن خلال أستخدام تفاعل البلمرة المتسلسلة PCRوبأستخدام باديء جين apH ذو الوزن الجزيئي ٤٦٦ زوج قاعدي ظهر أحتواء جميع العزلات البكتيرية الخمسين العائدة الى بكتريا الزوائف الزنجارية على هذا الجين وبنسخة واحدة بالأضافة الى ذلك فقد أحتوت العزلات التي تحمل الأرقام ٧، ٢٣، ٤٣ على نسخة ثانية من هذا الجين صورة (٢) أي ظهور نسختين من هذا الجين في هذه العزلات الثلاثة وهذا يعزى الى التغاير الوراثي في التكيف الجيني بالأضافة الى وجود التباين بين الصفات الجينية والصفات المظهرية حيث ظهروجود هذا الجين في جميع العزلات البكتيرية أما الصفات المظهرية عند الكشف عن هذا الأنزيم في وسط Skim milk agar فقد ظهرت هناك كثير من هذه العزلات لم تحتوي على هذه الصفة او منتجة للأنزيم على الرغم من وجود هذا الجين عند الكشف عنه جينياً، وهذا التباين قد يعزى الى التغاير الوراثي في التركيب الجيني ولذا لاتظهر جميع العزلات أنها تمتلك هذه الصفة مظهرياً بالرغم من وجودها في الطراز الجيني أو الوراثي لهذا الجين (١٦) لذا أظهرت نتائج الصفات المظهرية لبكتريا الزوائف الزنجارية عن أستعمال وسط Skim milk agar وجود هذه الصفة بنسبة ٧٥% الا أن عند تحليل الـ PCR أظهرت نتائج الجين وجوده بنسبة ١٠٠ % وهذا يكون مرتبطاً

بسببين رئيسيين وهو وجود الجين الذي يشفر للأنزيم الذي تعطي صفة تحليل للبروتين ويكون في بعض الأنواع غير فعال أو متوقف عن العمل لذا لا تظهر صفة التحلل مظهرياً، أما السبب الثاني فقد يكون مرتبط بعملية البناء الحيوي للبكتريا ويعبر جينياً عن هذه الصفة دون الحاجة الى تعرضه الى مؤثر لكي يعبر عن نفسه.

ومن خلال النتائج التي حصلنا عليها نجد أن هناك تطابق مابين الصفات المظهرية المحللة للبروتين في الوسط الزرعي ونتائج فحص الـ PCR للكشف عن وجود الجين وهذا يطابق لحد ما ما حصل عليه (١٧) الذي وجد أن نسبة هذا الجين الموجود في عزلات بكتريا الزوائف الزنجارية التي حصل عليها بنسبة ١٠٠% بينما (١٨) لم يجد هذا الجين في جميع العزلات التي درسها وهذا يكون متوافق نوعاً ما مع ما حصلنا علية.

من خلال ماتقدم نجد أن هناك وجود أرتباط مابين الصفات المظهرية والصفات الجينية حيث أظهرت نتائج الصفات المظهرية مع نتائج فحص الجين أن وجود الجين هو المسؤول عن الصفة المظهرية أضافة الى ان أنتاج أنزيم البروتيز القاعدي يتأثر بظروف الجسم الداخلية وكذلك بوجود مستويات عالية من Exotoxin A و Exoenzym S في عينات التي تأخذ منها هذه البكتريا وبالأخص عينات الجروح والقناة البولية وكل هذا يساعدها على غزو الأنسجة والتمهيد لتجرثم الدم وأن وجود هذه العزلات داخل الجسم المضيف يكون مرتبط مع زيادة أنتاج هذا الأنزيم.



صورة (٢) الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل البلمرة التسلسلي لسلسلة الـ DNA باستعمال البادئ apH على وسط هلام الأگاروز بتركيز ١.٥ % M : الدليل الحجمي C،466 bp : معامل السيطرة السالبة، 50 – 1: أرقام العزلات لبكتريا *Ps. aeruginosa*.

اظهرت نتائج التتابعات الجين apH عند اجراء المقارنة مع بنك المعلومات ضمن الموقع www.ncbi.nlm.gov عدم وجود اختلاف في تسلسلاته عدا بعض التسلسلات الخاصة بمكان وجود البادى وهذة لا تعتبر طفرة او تغير في الصفات لوجود اخطاء اثناء عملية كشف التتابعات، وكانت نسبة التطابق ٩٦% بمقارنتها مع بنك المعلومات للرقم التعريفي reflNC 002516.2

شكل (٢) وجد الباحث (١٩) ان هذا الجين المعزول من الحالات المرضية لالتهابات الجهاز التنفسي التابع لبكتريا الزوائف الزنجارية تعود لسلالة البكتيرية PAK. ومن خلال ما تقدم نجد ان التتابعات الخاصة بجين apr المعزول من العزلات المرضية التابعة لبكتيريا الزوائف الزنجارية تعود لسلالات مختلفة لنفس الجنس.

Pseudomonas aeruginosa chromosome, complete genome
Sequence ID: ref|NC_002516.2|Length: 6264404Number of Matches: 1
Features:
alkaline protease
Query 4
ACTACTCCCTGCACAGCGACAGCGGCCTGCCGGACTACGTG ACCGATTCCGCCGCCTCCG 63
||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 3689855
ACTACTCCCTGCACAAGGACAGCGGCCTGCCGGACTACGTG ACCGATTCCGCCGCCTCCG 3689914
Query 64
CCACCGCCTGGTCCACCGGGGTCAAGTCGTACAACGGCGCG ATCGGCGTGGATATCCACG 123
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 3689915
CCACCGCCTGGTCCACCGGGGTCAAGTCGTACAACGGCGCG ATCGGCGTGGATATCCACG 3689974
Query 124
AACAGCCGCACCGCAACCTGCTGGAGCTGGCCAAGCTCAAC GGCAAGGCCACCGGCAACG 183
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 3689975
AACAGCCGCACCGCAACCTGCTGGAGCTGGCCAAGCTCAAC GGCAAGGCCACCGGCAACG 3690034
Query 184
TCTCCACCGCCGAGCTGCAGGACGCCACCCCCGCCGCCCTG CTCGCCCACGTCACCGCTC 243
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 3690035
TCTCCACCGCCGAGCTGCAGGACGCCACCCCCGCCGCCCTG CTCGCCCACGTCACCGCTC 3690094
Query 244
GCAAGTGCTACGGTCCCGAGGCCACCAGCAAGCAGTGCCCG AGCAATGCCCTGGAGAACG 303
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 3690095
GCAAGTGCTACGGTCCCGAGGCCACCAGCAAGCAGTGCCCG AGCAATGCCCTGGAGAACG 3690154

Query 304
GCGGCGCCGGCTCGATCACCGAGCAGTGGCTGAAGACCCGC CCTGACGTGGTTCTCGGCG 363
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 3690155
GCGGCGCCGGCTCGATCACCGAGCAGTGGCTGAAGACCCGC CCTGACGTGGTTCTCGGCG 3690214

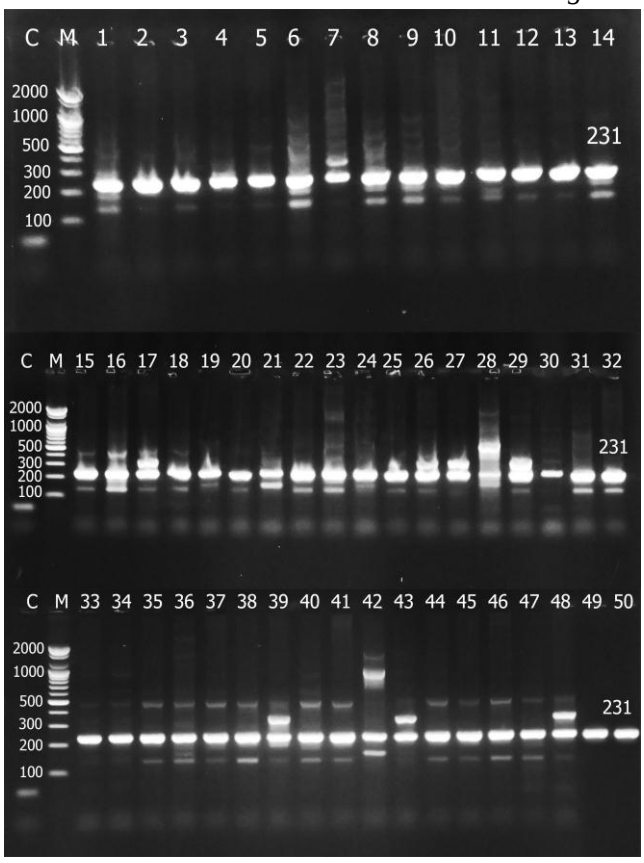
Query 364
GCGGCGCCGCGACCTTCGCGGAAACCGCCAAGGCTGGCCGC TATGCCGGCAAGACCCTCC 423
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 3690215
GCGGCGCCGCGACCTTCGCGGAAACCGCCAAGGCTGGCCGC TATGCCGGCAAGACCCTCC 3690274

Query 424
GCGCCCAGGCCGAAGCCCGCGGCTACGCAATCGTCGAGACC CT 466
|||||||||||||||||||||||| |||||||||| |||
Sbjct 3690275
GCGCCCAGGCCGAAGCCCGCGGCTACCGGATCGTCGAGAAC CT 3690317

شكل (٢) تسلسلات القواعد النيتروجينية للجين apH

– الكشف عن وجود جين lasBالمسؤول عن أنزيم Peptydase في بكتريا*Pseudomona aeruginosa* :

أستعمل البادىء lasB ذو الوزن *الجزيئي* ٢٣١ زوج قاعدي في تفاعل PCR للكشف عن وجود الجين المسؤول عن أفراز أنزيم Peptydase وأظهرت نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الأگاروز بتركيز ١.٥ % ظهور حزم هذا الجين في جميع العزلات البكتيرية، وقد ظهر وجوده في أغلب العزلات بأكثر من نسخة لهذا الجين بأستثناء العزلات ٢، ٣، ٤، ٥، ١٢، ١٣، ٣٠، ٣٣، ٣٤، ٤٩. ٥٠ بنسخة واحدة فقط صورة (٣) وهذا يتفق كليا مع ما توصل الية (١٨) حيث اجريت الدراسة على ١٤٥ عزلة بكتيرية معزولة من مصادر مختلفة ووجد ان جميع العزلات تمتلك الجين المسؤول عن انتاج هذا الانزيم. في حين نتائج دراستنا لا تتفق مع ما توصل الية (٢٠) حيث توصل الى ان نسبة جين lasB هي 18% في العزلات المختلفة لبكتريا *Pseudomona aeruginosa*



صورة (٣) الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل البلمرة التسلسلي لسلسلة الـ DNA باستعمال البادئ lasB على وسط هلام الأگاروز بتركيز ١.٥ % M : الدليل الحجمي C،231 bp : معامل السيطرة السالبة، 50 – 1: أرقام العزلات لبكتريا Ps. aeruginosa.

اظهرت نتائج الدراسة عند اجراء تطابق مع بنك المعلومات للجين lasB ذو الرقم التعريفي 002516.2 refINC ان كشف التتابعات لسلالات التي اظهرت تغاير في تضاعف هذا الجين اظهرت ايضا تغايرها في تسلسلات هذا الجين عن لبجين القياسي المعروف في الموقع www.ncbi.nlm.gov وهذا يدل على اختلاف هذا الجين الذي يعتبر احد عوامل الضراوة في بكتريا الزوائف الزنجارية او وجود سلالات متعددة للبكتريا كما اظهرت نتائج التطابق قريبها من السلاله البكتيرية PA1 شكل (٣).

كما اشار (٢١) ان التتابعات لسلالات البكتيرية المعزولة من الحالات المرضية تعود الى السلالة البكتيرية PAO1في حين توصل (٢٢) ان التتابعات لسلالات لبكتريا الزوائف الزنجارية تعود الى السلالة PAK.

Pseudomonas aeruginosa PAO1 chromosome, complete genome
Sequence ID: ref|NC_002516.2|Length: 6264404Number of Matches: 1
Features:
elastase LasB
Query 1 TATAGCCCTCGGATGCCTCGCCGGCCATGTCGGAGAACGCTTCGTTCATTCCGAAGTTAC 60
||||| |||| |||||||||||||||||||||||||||||| |
Sbjct 4169361 TATAGAACTCGGCAGCCTCGCCGGCCATGTCGGAGAACGCTTCGTTCATTCCG--CCT-- 4169416

Query 61 CATTGCCCGCGGTAGATCAGCCCGGAGTTCTGCTCAAGT-AAGCCGTGGCTGACCTCGTG 119
||||||||||||||||||||||||||||||| || ||||||||||||||||||
Sbjct 4169417 GATTGCCCGCGGTAGATCAGCCCGGAGTTCTGCTC-GGTGAAGCCGTGGCTGACCTCGTG 4169475

Query 120 GGCCGCCACGTCCAGCCCCACCAGCGGATAGAACAAAAAAGGTGGCGCCGTCGCCGAAGA 179
|||||||||||||| |||||||||||||| | ||||||||||||||||||
Sbjct 4169476 GGCCGCCACGTCCAGCGACACCAGCGGATAGAAC----ATGGTGGCGCCGTCGCCGAAGA 4169531

Query 180 GCATCGCCGTGCCGTCCCAGTAGG---TCTCCACGCTGCGCCCG 220
||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||
Sbjct 4169532 GCATCGCCGTGCCGTCCCAGTAGGCGTTCTCCACGCTGCGCCCG 4169575

شكل (٣) تسلسلات القواعد النيتروجينية للجين lasB

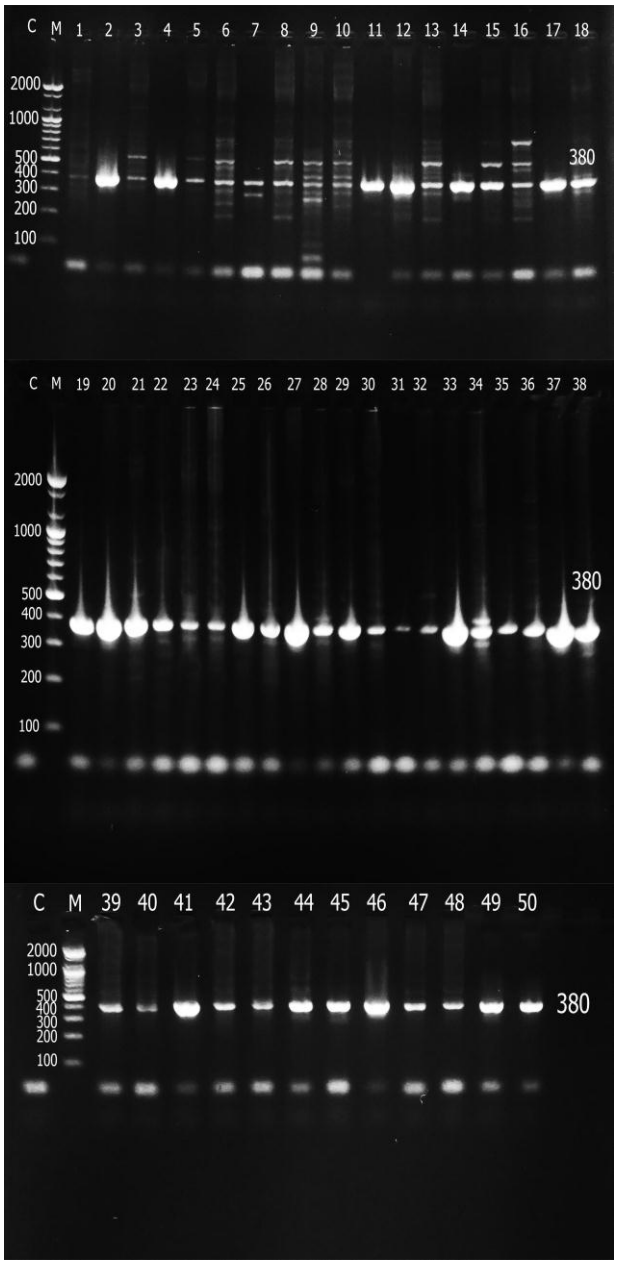
- الكشف عن جين flcBفي بكتريا *Pseudomona aeruginosa* :

أجري تفاعل البلمرة المتسلسل لسلسلة الـ DNA بأستعمال البادئ flcB مع مزيج التفاعل وباستخدام الكت الخاص لغرض الكشف عن هذا الجين بحجم ٣٨٠ زوج قاعدي وبعد أجراء هذا التفاعل وفق البرنامج الخاص به ومن ثم أجري الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز بتركيز ١.٥ % وفحص بالأشعة فوق البنفسجية. حيث أظهرت نتائج الترحيل أن كل العزلات البكتيرية الـ ٥٠ من بكتريا الزوائف الزنجارية تحتوي على السوط بالأضافة الى ذلك فقد أحتوى قسم من هذه العزلات على أكثر من نسخة لهذا الجين وهي العزلات التي تحمل الأرقام ٣، ٦، ٨، ٩، ١٠، ١٣، ١٥، ١٦ صورة (٤). ومن المعروف أن الأسواط في العديد من البكتريا التي تحتوي عليها تستخدم من قبل هذه البكتريا في عملية التنقل والحركة أن بكتريا الزوائف الزنجارية تحتوي على سوط قطبي منفرد يعتبر من عوامل الضراوة والحركة وهي الخطوة الأولى للأصابة بهذه البكتريا وجاءت هذه الدراسة متوافقة مع ما توصل الية (٤) حيث وجد هذا الجين في أغلب العزلات المدروسة حيث يعود الى سلالة PAO1 وأن قسماً من هذه العزلات يعود الى السلالة PAK. بينما وجد (٢٣) أن حدوث أختلاف في جين flcB يعطل تشفير Cap في السوط مما يؤدي الى أختزال عملية الألتصاق وتقليل حدوث الأصابة.

اما نتائج تتابعات جين flcB العائد لبكتيريا الزوائف الزنجارية فقد اظهرت بعد اجراء المقارنة مع بنك المعلومات لنفس الرقم التعريفي refINC002516.2 عدم وجود اختلاف في كشف التتابعات للعزلة التي ارسلت لاختبار الجين حيث انه مظهريا لا توجد لدينا الاجهزة وخصوصا المجهر الالكتروني التي تمكننا من الكشف عن التباينات في وجود الاسواط من ناحية الشكل والطول في البكتريا لذا اعتمدنا على وجود هذا الجين للكشف عنة كصفة تشخيصية في بكتريا الزوائف الزنجارية وكاحد عوامل ضراوتها المهم ومن خلال الصورة (٤) ظهر وجود هذا الجين في جميع العزلات البكتيرية على الرغم من وجود بعض الاختلاف في نسخ هذا الجين في بعض العزلات وعند ارسالها لكشف عن التتابعات الجينية اوضحت نتائج التشفير لة وجود تطابق جيني عالي لهذ الجين شكل(٤). وجاءت نتائجنا متطابقة مع ما جاء به (٢٤) وان التتابعات ظهرت في هذه الدراسة تمثل الجين flcB وهذا يتفق مع ما توصل الية كل من (٢٥ و٢٦).

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) ***مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة*** Open Access
2015 ,(9), (3) :144-155

صورة (٤) الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل البلمرة التسلسلي لسلسلة الـ DNA باستعمال البادئ flcB على وسط هلام الأكاروز بتركيز ١.٥ % M : الدليل الحجمي 380 bp ،C : معامل السيطرة السالبة، 50 – 1: أرقام العزلات لبكتريا Ps. aeruginosa.



Pseudomonas aeruginosa PA1 chromosome, complete genome
Sequence ID: ref|NC_002516.2|Length: 6264404Number of Matches: 1
Features:
flagellin type B
Query 1
GGCCCTTAATGTCAACACGAACATTGCTTCCCTGAACACTCAGC
GCAACCTGAATGCTTC 60
|||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1183060
GGCCCTTACAGTCAACACGAACATTGCTTCCCTGAACACTCAGC
GCAACCTGAATGCTTC 1183119
Query 61
TTCCAACGACCTCAACACCTCGTTGCAGCGTCTGACCACCGGCT
ACCGCATCAACAGTGC 120
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1183120
TTCCAACGACCTCAACACCTCGTTGCAGCGTCTGACCACCGGCT
ACCGCATCAACAGTGC 1183179
Query 121
CAAGGACGATGCTGCCGGCCTGCAGATCTCCAACCGCCTGTCCA
ACCAGATCAGCGGTCT 180
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1183180
CAAGGACGATGCTGCCGGCCTGCAGATCTCCAACCGCCTGTCCA
ACCAGATCAGCGGTCT 1183239
Query 181
GAACGTTGCCACCCGCAACGCCAACGACGGCATCTCCCTGGCGC
AGACCGCTGAAGGTGC 240
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1183240
GAACGTTGCCACCCGCAACGCCAACGACGGCATCTCCCTGGCGC
AGACCGCTGAAGGTGC 1183299
Query 241
CCTGCAGCAGTCCACCAATATCCTGCAGCGTATCCGCGACCTGG
CCCTGCAATCCGCCAA 300
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1183300
CCTGCAGCAGTCCACCAATATCCTGCAGCGTATCCGCGACCTGG
CCCTGCAATCCGCCAA 1183359
Query 301 CGGCTCCAACAGCGAC 316
||||||||||||||||
Sbjct 1183360 CGGCTCCAACAGCGAC 1183375

شكل (٤) تسلسلات القواعد النيتروجينية للجين flcB

المصادر

1- Aline Maria،Mariana Carman and Ani Irown. (2013). Virulence markers in Pseudomonas aeruginosa isolates from hospital acqured infection occurred in patients with underlying cardiovasular disease.Biol. vol.18.N.6.
2- Nastaran Fazeli and Hassan Momtaz (2014). Virulence gene profiles of multidrug – resistant Pseudomonas aeruginosa isolated from Iranian hospital infections. Dol : 10.5812.
3- Bhataia، R. ; Lchhpujani، R. (2004). Essentionals of Medical Microbiology. Jaypee Brothers medical publishers (p) LTD، New Delhi. P (271 – 273)
4- Nibin VS,aslani MM and Sharafi Z. (2012). Molecular indentification and detection of virulence genes among Pseudomonas aeruginosa isolated from different infections origins.
5- Wathiq Abbas Al-Daraghi and Zaid Husamuldeen (2013). Detection of ExotoxinA gene in Pseudomonas aeruginosa from clinical and environmental samples. J. Al-Nohrain vol. 16(2).
6- Deitri v.،Robert F.,Phillips G. and Linda S. (2001). Functhonal analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine 1-carboxamide for Pseudomonas aeruginosa PAO1.
7- Baron،E.J. and Finedgold، S.M. (1990) Diagnostic microbiology. 8th ed. Mosby –Year – Book. Inc. Missouri. USA.

O'Callaghan.(2009). Properties of PASP:A Pseudomonas Protease Capable of Mediating Corneal Erosions. Invest Ophthalmol Vis Sci, 50(8):3794-3801.

18- Caballero، A.; Moreau, J.M.; Engel, L.S.; Marquart, M.E.; Hill, S.H. and O'Callaghan, R.(2001). Pseudomonas aeruginosa proteaseIV enzyme assays and comparison to other Pseudomonas protease. Anal. Biochem. 290 (2): 330-337

19- Spencer DH., Kas A., Smith EE., and Smis EH.(2003). Whole – genome. Sequence variation among multiple isolatetes of Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol. 185:1316- 1325.

20- -Hossein Esameili1، Ali Khanjari and Fatemeh Gholami. (2015). Detection and characterization of Escherichia coli O157:H7 from feral pigeon in Qom province, Iran. Journal of Tropical Disease : 5(2) 116- 118.

21- Lauotte P, Mereghetti L and Quentin R. (2004). Genetic features of Pseudomonas aeruginosa isolates cystic fibiosis patients. J. Med Microbiol 53: 73 – 81.

22- Cowell.A.; Twining, S.S.; Hobden, J.A.; Kwong, M.S. and Fleiszig, M.J. (2003). Mutation of lasA and lasB reduces Pseudomonas aeruginosa invasion of epithelial cells. Microbiol. 149: 2291-2299.

23- Arora، S.K.; Wolfgang, M.C.; Lory, S. and Ramphal, R. (2004). Sequence polymorphism in the glycosylation island and flagellins of Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol. 186: 2115-2122.

24- Zhizhou Kuang، Shiping Zhang and Youghua Hao (2011). The Pseudomonas aeruginosa flagellum confers resistance to pulmoary surfactant protein – A by impacting the production of exoproteases through quorum- sensing.

25- Yingli Li, Huming Xia and Fang Bai (2007). Indentication of new gene PA5017 involved in Pseudomonas aeruginosa.

26- Gholamreza. Morteza and Ahmed Hosseini (2009). Cloning, expression, purification and characterization or recombinantb flagellin isolated from Pseudomonas aeruginosa Biotechnol Lett 31: 1353- 1360.

8- Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Stalyt, J.T. and Williams, S.T. (1994). Bergey`s manual of determinative bacteriology. Williams and Wilkins Publication. 9th ed. London, New York.

9- Vandepitte, J. ; Engback, K. ; Piot, P. and Heuck, C.C.(1991).Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. WHO., Geneva.، PP: 78-110.

10- Arif,Sehand K. and Salih, layla I.F. (2010). Identification of Different Categories of Diarrheagenic Escherichia coli in Stool Samples by Using Multiplex PCR Technique. J. Medical Sciences. 2(5): 237-243.

11- Blahna MT, Zalewski CA, Reuer J, Kahlmeter G, Foxman B, Marrs CF (2006). The role of horizontal gene transfer in the spread of trimethoprim–sulfamethoxazole resistance among uropathogenic Escherichia coli in Europe and Canada. J Antimicrob Chemother ;57:666–72.

12- Abbas Ali Fooledi،Abdoulreza and Reza Nourani. (2012). Evaluation of the pathogensis of Pseudomonas aeruginosa flagellum befor and after flagellar gene knockdown by SiRNA.

13- Shuang – Hong chen، Rhi – youg chen، Xiong – Lixu and Wei – Bin Xiao. (2011). Microarray analysis and phenotypic response of Pseudomonas aeruginosa PAO1 under hyperbaric oxyhelium condition.

14- - Totten، P. A., Lara, J.C., and Lory، S. (1990) characterization of the type a flagellin gene from Pseudomonas aeruginosa PAK. J. Bacterial 172: 389-396.

15- Stover C.K.,Pham X.Q.,Erwin A.L.,P. Hikey.(2000).Complete genome sequence of Ps. Aeruginosa PAO1 an opportunistic pathogon. Nature، 406(6799).

16- Melican, K. ; Sandoval, R. M. ; Abdul- Kader ; Josefsson, L. ; Tanner, G. A. ; Molitoris, B. A. and Richter-Dahlfors, A. (2011). Uropathogenic Escherichia coli P and type 1 fimbriae act in synergy in a living host to facilitate renal colonization leading to nephron obstruction. PLoS Pathogens، 7 (2): 100-112.

17- Aihua Tang, Mary E. Marquart, Jonath D. Fratkin, Clare C. McCormick,– Armando R Caballero, Hattie P. Gatlin and Richard J.

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2015 ,(9), (3) :144-155

Molecular Variation Study of Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* for 16SrRNA,pvdE, toxA, and phzM Genes Related with Virulence and Characterization Features.

Ahmed M. Yousif Ahmed M. Turky Ahmed A. Sulaiman

E.mail:

Abstract:-

This study includes collection of 438 clinical samples from Ramadi Educational Hospital and 50 of soil samples in period from Nov. 2014 to Feb. 2015, to isolate Pseudomonas aeruginosa and the resulted isolates were divided into 40 clinical isolates form burns, wounds، urine and ear inflammation, and 10 from soil.Antiobiotic sensitivity test were done against 12 antibiotic discs for all 50 selected isolates by disc diffusion method, and the results indicated that all clinical isolates were resistance to three types of antibiotics(Penicillin, Ampicillin, Amoxicilline) while they varied in their resistance to other antibiotics. The soil isolates were 100% sensitive to all antibiotics except for penicillin and ampicillin were resistance with 60%and 70% respectively.

Also the molecular variation for these isolates for virulence factors were detected and the characterization of bacteria was confirmed by checking 16SrRNA gene, after the specific primers were designed for each gene of virulence which included apH,flcB and lasB also specific primer for 16SrRNA was designed. The results showed that the characterization of bacteria was confirmed by 16SrRNA gene detection and sequence and the isolates contain the virulence genes had some polymorphism in comparison with those in NCBI.