P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (JUAPS) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2016,10 (3) :01-07

التشخيص الجزيئي للكتينات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* باستخدام تفاعل البلمرة المتعدد (*LecA* and *LecB)*

احمد نوري حامد* صفاء عبد لطيف * محمد ابراهيم نادر**

* جامعة الانبار – كلية العلوم
** جامعة بغداد – معهد الهندسة الوراثية والتقانات الاحيائية

معلومات البحث:
تاريخ التسليم: 2017//01/09
تاريخ القبول: 2017/03/07
تاريخ النشر: 27/ 12/ 2017
DOI:10.37652/juaps.2016.134878

الكلمات المفتاحية:
الزائف الزنجارية,
تفاعل البلمرة المتسلسل،
16S rRNA،
اختبار الحساسية،
اللكتينات.

الخلاصة:

جمعت 152 عينة سريرية شملت عينات الحروق والتهاب الاذن والجروح من بعض مستشفيات بغداد، اما عزلات التليف الكيسي فقد حصل عليها من طلبة الدراسات العليا في معهد الهندسة الوراثية وعددها (6) وكما جمعت 67 عينة بيئية، وبعد العزل والتشخيص تم الحصول على 83 عزلة من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* . اختيرت بشكل عشوائي 54 عزلة شملت 44 عزلة سريرية و10 عزلات بيئية لاجراء اختبار الحساسية تجاه 11 نوع من المضادات الحيوية واختيرت 35 عزلة اعتماداً على اختبار الحساسية لاجراء اختبارات الكشف عن جينات*16S rRNA*، *LecA* و *LecB* ، اذ اظهرت العزلات مقاومة عالية لمضادات Ampicillin، Amoxicillin و Nalidixic acid بلغت 94%، 90.7%, 92.5% على التوالي ثم تدرجت مقاومة البكتريا لمضادات Cefotaxime، Ceftazidimim، Tetracycline، Amikacin , Augmantin، Vancomycin و Chloramphenicol في حين كانت نسبة المقاومة منخفضة لمضاد Imipenem بلغت 22.2%. اظهرت نتائج الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل البلمرة المتسلسل لجين (*16S rRNA*) الذي يعتبر جيناً تشخيصياً حزماً ضمن الحجم المتوقع للجين (956 زوج قاعدي) ولجميع العزلات السريرية والبيئية، كما اظهرت نتائج الترحيل الكهربائي للكشف عن جينات *LecA* و *LecB* حزماً بحجم (369 و 226 زوج قاعدي) على التوالي ولجميع العزلات السريرية والبيئية.

المقدمة:

تعد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من الاجناس البكتيرية واسعة الانتشار في الطبيعة وذات امراضيه عالية للانسان والحيوان والنبات، فهي أحد أهم الانواع البكتيرية المسببة لما يعرف بالاصابات المكتسبة في المستشفيات (1)، وتسبب امراضاً عديدة في جسم الانسان، منها اخماج الجروح والحروق واخماج العين واخماج الجلد والمجاري البولية والاذن الوسطى وتجرثم الدم واخماج العظام والمفاصل (2) .

يعزى سبب قدرة هذه البكتريا على احداث الاصابات الشديدة وانتشارها، لقدرتها على استعمار مواقع عديدة بسبب امتلاكها آليات التصاق فعالة وعدم احتياجها لمتطلبات تغذوية معقدة ومقاومتها للمضادات المايكروبية وقدرتها على تكوين الغشاء الحيوي وانتاج انزيم البروتيز(3) . تمتلك بكتريا *P. aeruginosa* القدرة على مقاومة مدى واسع ومتنوع من المضادات الحيوية، الشيء الذي جعلها من بين أهم و أخطر مسببات الأمراض للإنسان (4) .

تنتج البكتريا نوعين من اللكتينات هما لكتينA و لكتينB، وترتبط هذه الكتينات بالكربوهيدرات اذ يرتبط لكتينA تحديداً بسكر الكالكتوز بينما يرتبط لكتينB بسكر الفيوكوز وتلعب هذه اللكتينات دوراً مهماً في التصاق البكتريا على سطوح الخلايا المضيفة (5) . تكمن

* Corresponding author at : College of Science, University of Anbar. E-mail address:

اهمية اللكتينات في كونها عامل ضراوة يرتبط مع عوامل الضراوة الاخرى و تنتج البكتريا هذه اللكتينات عندما تصل الى الطور الثابت من مراحل نموها والتي يشفر لها جينات موجودة في مادتها الوراثية وينظم التعبير عنها بالمشاركة مع بعض عوامل الضراوة الاخرى وهذا التنظيم يقع تحت سيطرة ظاهرة التحسس (6) . اللكتينات هي بروتينات تتصف بقدرتها على التفاعلات التلازنية مع كريات الدم الحمر عن طريق التفاعل مع جزيئات محددة من السكر على سطح كريات الدم ويمكن تثبيط مثل هذه التفاعلات بواسطة انواع مختلفة من السكريات (7) . تتواجد اللكتينات على سطوح خلايا البكتريا او في مستخلص الخلايا الحاوية عليها، وازداد اهتمام الباحثين باللكتينات لما لها من دور كبير اذ تعمل كجزيئات تعريف عند التفاعل بين البكتريا والخلايا الطلائية والخلايا البلعمية، ونتيجة لتخصصها على الارتباط بالسكريات تعد من الادوات المهمة في تمييز المستقبلات السطحية للخلية (8) . وهدفت الدراسة الى تشخيص جينات اللكتينات لبكتريا الزوائف الزنجارية لاثبات وجود العلاقة الطردية بينها وبين عوامل الضراوة الأخرى.

المواد وطرق العمل

جمع العينات : جمعت 152 عينة من مرضى يعانون من مختلف الحالات المرضية شملت أخماج الحروق، الجروح و التهاب الاذن الوسطى . إذ تم الحصول على العينات من مختبرات بعض المستشفيات في بغداد شملت مستشفى اليرموك التعليمي ومستشفى الكندي والمختبرات التعليمية ومستشفى الشيخ زايد، اما عينات التليف الكيسي فقد حصل عليها من طلبة الدراسات العليا في معهد الهندسة الوراثية والبالغة 6 عينات، وجمعت 67 عينة مأخوذة من مواقع بيئية مختلفة (تربة و مياه) من شهر تشرين الثاني 2015 الى شهر نيسان 2016.

تشخيص العزلات: شخصت العزلات اعتماداً على (9) باستعمال الطرق الزرعية باستخدام عدة اوساط زرعية منها وسط اكار الماكونكي و وسط اكار الدم و وسط اكار السترمايد واستعملت الفحوصات البايوكيميائية مثل الاوكسيديز والكاتليز واختبار الاندول واحمر المثيل وفوكاس بروسكاور واستهلاك السترات اذ تم الحصول على 83 عزلة تعود لبكتريا *P. aeruginosa*.

اختبار حساسية عزلات بكتريا *P. aeruginosa* للمضادات الحيوية:اعتمدت طريقة Kirby Bauer لاجراء فحص الحساسية للمضادات الحيوية وباستعمال وسط اكار مولر هنتون واختبرت مقاومة المضادات الحيوية Amoxicillin,(25) ،Ampicillin(10) ،Cefotaxime(30) ،Nalidixic acid(30) (30)،Tetracycline (30)،Ceftazidimim(10) ،Augmantin (10),Amikacin Chloramphenicol(30) ،Vancomycin(30) و Imipenem(10)، وقورنت مع الجداول القياسية لمنظمة الصحة العالمية (10)

استخلاص DNA الكروموسومي: استخلصت عينات DNA الكروموسومي للعزلات البكتيرية باستخدام عدة استخلاص DNA الكروموسومي للبكتريا المنتج من شركة Promega(USA).

التحري عن الجينات باستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل PCR :

أجريت تفاعلات البلمرة المتسلسل تحت ظروف معقمة ل(35) عزلة من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* بالاضافة الى عينة السيطرة، انتخبت من مواقع الإصابات المختلفة اعتماداً على انتاجها لعوامل الضراوة وبواقع 8 عزلات من الحروق و8 عزلات من الجروح و5 عزلات من الاذن و8 عزلات بيئية وباستخدام البوادئ في الجدول (1) . واستخدمت البرامج الخاصة بتفاعل البلمرة المتسلسل لكل جين الموضحه في الجدول (2) و(3) .

جدول (1) البادئات المستخدمة في تفاعل البلمرة المتسلسل PCR.

اسم البادئ	تسلسل قواعد البادئ 5→3	Tm* درجة مئوية	حجم الجين المستهدف زوج قاعدي	حجم الجين	رقم الدخول و موقع الجين
lecA-F**	ATGGC TTGGA AAGGT GAG	60	369	369	NC-002516.2(2905182-2905510)
lecA-R***	TCAGG ACTGAT CCTTTC C	58			

LecB-F LecB-R	GGCAACACA AGGAGTGTTC A	60	226	348	NC-002516.2(3773029-3773376)
	ATTACCT GTGCCG AGACCA G	60			
16S rRNA-F 16S rRNA-R	GGGGGA TCTTCGG ACCTCA	69	956	1466	AY268175.1
	TCCTTAG AGTGCC CACCCG	70			

* (Melting tempreture) :Tm، ** (Forward) :F، *** (Reverse) :R.

جدول (2) برنامج جهاز المبلمر الحراري الخاص بمزيج تفاعل البلمرة المتسلسل للبادئ *16S rRNA*

الرقم	الخطوة	درجة الحرارة (C˚)	الوقت	عدد الدورات
1	Initial denaturation	95	2 دقيقة	1
2	Denaturation	94	30 ثانية	30
3	Annealing	64	30 ثانية	30
4	Extension	72	1 دقيقة	30
5	Final extension	72	7 دقيقة	1

جدول (3) برنامج جهاز المبلمر الحراري الخاص بمزيج تفاعل البلمرة المتسلسل للبادئ *lecA* و*LecB*

الرقم	الخطوة	درجة الحرارة (C˚)	الوقت	عدد الدورات
1	Initial denaturation	95	2 دقيقة	1
2	Denaturation	94	30 ثانية	25
3	Annealing	58	30 ثانية	25
4	Extension	72	30 ثانية	25
5	Final extension	72	7 دقيقة	1

كشف عن نواتج التضاعف بترحيل العينات على هلام الاكاروز والمحضر بتركيز (1.5) % مع ترحيل الدليل الحجمي 100 زوج قاعدي بفرق جهد 70 فولت لمدة 1 – 1.5 ساعة بعد التصبيغ بصبغة بروميد الاثيديوم بتركيز 40 مايكروليتر/لتر, فحص الهلام بعد انتهاء الترحيل من خلال تعريضه لمصدر الاشعة فوق البنفسجية وتم تصويره بكاميرا رقمية .

النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج العزل والتشخيص الحصول على 83 عزلة تعود لبكتريا *P. aeruginosa* توزعت بواقع 25 عزلة من الحروق، 14 عزلة من التهاب الاذن و17 عزلة من الجروح و 6 عزلات من التليف الكيسي و 13 عزلة من التربة و8 عزلة من المياه كما في جدول (4) .

جدول (4) اعداد ونسب بكتريا *P. aeruginosa* في العينات المرضية والبيئية

التسلسل	مصدر العينة	عدد العينات	عزلات *P. aeruginosa*	النسبة %
-1	الحروق	62	25	%40.3
-2	الأذن	42	14	% 33.33
-3	الجروح	48	17	% 35.4
-4	التليف الكيسي	6	6	%100
- 5	التربة	40	13	% 32.5
-6	المياه	27	8	%29.6
المجموع		225	83	%36.88

أظهرت النتائج للعزلات المرضية ان عزلات الحروق جاءت بالدرجة الأولى مقارنة مع بقية العزلات إذ بلغت 25 عزلة من بكتريا الزوائف الزنجارية بنسبة 40.3% وقد يعود سبب ذلك الى ان هذه البكتريا من الممرضات الانتهازية التي تنتهز فرصة حدوث خلل عام أو موضعي في أحدى دفاعات الجسم الميكانيكية أو المناعية أو كليهما معاً لاحداث الاصابة (11) .

اختبار حساسية عزلات بكتريا *P. aeruginosa* للمضادات الحيوية

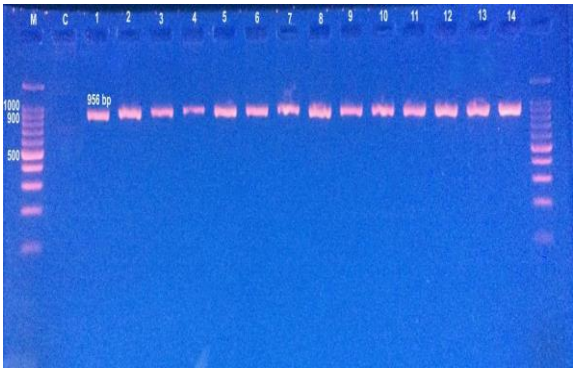
أظهرت نتائج اختبار حساسية العزلات المرضية والبيئية أن هناك مقاومة عالية جداً أبدتها عزلات بكتريا *P. aeruginosa* لمضادات البيتالاكتام والمتمثلة (بمجموعة البنسلين) مثل Ampicillin و Amoxicillin وبنسبة 94% و90.7 % على التوالي وهذا يتفق مع النتائج التي حصل عليها (12) إذ كانت نسبة المقاومة لهذين المضادين 100% . فسر هذه النتائج (13) ان مقاومة البكتريا

العالية لمضادات البيتالاكتام تعود إلى إمتلاكها عوامل مساعدة في مقاومة هذه المضادات والتي تتمثل بإنتاج إنزيمات البيتا لاكتاميز التي تعمل على تحطيم حلقة البيتالاكتام لهذه المضادات مما يؤدي إلى تحوير تركيب المضاد وإبطال تأثيره . اظهرت النتائج ان نسبة مقاومة هذه العزلات لمضاد Nalidixic acid كانت 92.5%، وتتفق هذه النتيجة مع الباحث (14) اذ حصلت عزلاتها على نسبة مقاومة لمضاد Nalidixic acid بلغت 100% .

بينت النتائج ان نسبة مقاومة العزلات لمضادات السيفالوسبورينات المتمثلة Ceftazidimim كانت 70.3 % اما مضاد Cefotaxime فقد كانت نسبة المقاومة 83.3%، اتفقت هذه النتائج مع دراسة (15) التي وجدت أن نسب المقاومة لمضاد Ceftazidimim 71%، كذلك اتفقت نتائجنا مع (16) الذي وجد نسبة المقاومة لمضاد Cefotaxime 90%، ويمكن تفسير المقاومة العالية تجاه هذه المجموعة من المضادات إلى كثرة إستخدامها . بينت النتائج ان نسبة المقاومة لمضاد Imipenem كانت 22.2%، اتفقت هذه النتيجة مع (17) حيث حصل على نسبة 17.33% . بينت النتائج ان نسبة مقاومة العزلات لمضاد Amikacin كانت 72.2 **%**، اتفقت النتائج مع (18) الذي ذكر ان نسبة المقاومة لمضاد Amikacin كانت 75% . اظهرت النتائج ان نسبة مقاومة العزلات لمضاد Tetracycline كانت 81.4 **%** وهذا يتفق مع (19) حيث اشار الى ان نسبة مقاومة البكتريا *P. aeruginosa* المعزولة من النماذج المرضية المختلفة لهذا المضاد قد بلغت 87.5 %، فسر (20)هذه النتائج على انها بسبب فعالية أنظمة دفق العقاقير التي تعد من الأنظمة المميزة الفعالة في جرثومة *P. aeruginosa* . بينت النتائج ان نسبة المقاومة لمضاد Chloramphenicol كانت 44.4 %، اختلفت هذه النتائج مع (21) الذي حصل على نسبة مقاومة لهذا المضاد 100 %، فسر (22) ان سبب مقاومة بكتريا *P. aeruginosa* لهذا المضاد يعود الى اشتراك مضخات الدفق مع النفاذية المنخفضة لغشائها في انتاج المقاومة لمضاد Chloramphenicol . بينت النتائج ان نسبة المقاومة لمضاد Augmantin بلغت 51.8%، اتفقت النتائج مع (23) الذي وجد ان نسبة المقاومة لهذا المضاد كانت 47.5%، أما بالنسبة لمضاد Vancomycin فقد كانت نسبة المقاومة له 38.8% وهذا لايتفق مع (24) الذي وجد ان نسبة المقاومة لهذا المضاد 74.41% .

الكشف عن جين *16S rRNA* لبكتريا *P. aeruginosa* :

اظهرت نتائج الترحيل الكهربائي لنواتج التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا باستخدام البادئ للجين *16S rRNA* الذي يقع في المنطقة الكروموسومية، والذي يعد من الجينات التي يعتمد عليها في تشخيص بكتريا *P. aeruginosa* حزم ذات حجم جزيئي 956 زوجاً قاعدياً للعزلات البكتيرية جميعها مما يعني وجود الجين المستهدف لهذه العزلات الشكل (1) . وهذا يدعم نتائج التشخيص بالطرق الاعتيادية المظهرية والبايوكيميائية من أن هذه العزلات تعود الى بكتريا *P. aeruginosa* . ومن خلال النتائج وجد أن صفة هذا الجين هي صفة سائدة في كل سلالات بكتريا *P. aeruginosa* مما يعني أن هذه البكتريا تمتلك الجين الحامل للشفرة الوراثية الخاصة لصفة تشخيص هذه البكتريا *16S rRNA* وبذلك تشير هذه النتائج إلى أن هذا الجين يعد جيناً تشخيصياً لهذه البكتريا من خلال تطابق نتائجه مع نتائج الفحوصات الروتينية التشخيصية . تتفق هذه النتائج مع (25) اللذان وجدا ان جميع العزلات المدروسة تحتوي الجين *16S rRNA* .

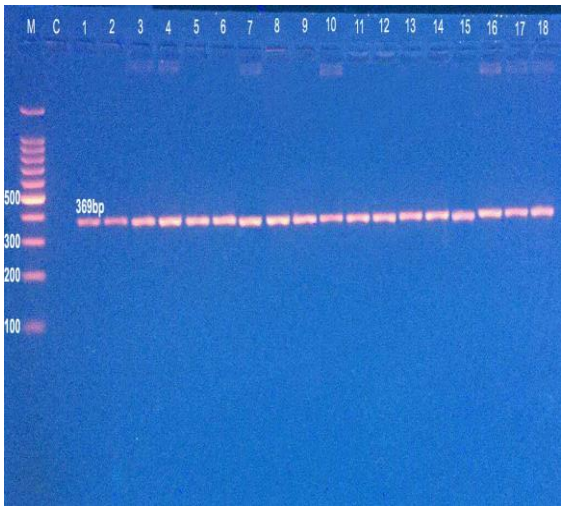


الشكل (1) الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل البلمرة المتسلسل لسلسلة الدنا باستعمال البادئ *16S rRNA* (956 زوج قاعدي) على وسط هلام الأگاروز بتركيز 1.5 % M : الدليل الحجمي 100 زوج قاعدي، C معامل السيطرة السالبة، (1 – 14): أرقام العزلات لبكتريا *P. aeruginosa*.

الكشف عن جين *LecA*

أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل البلمرة المتسلسل لجين *LecA* باستخدام البوادئ المحددة لهذا الجين على هلام الاكاروز حزم ضمن الحجم المتوقع للجين (369 زوج قاعدي) شملت 35 عزلة الشكل (2) . اتفقت النتائج مع (26) الذي اشار لوجود الجين في جميع عزلات بكتريا الزوائف الزنجارية . تنظيم التعبير الجيني للكتين A معقد ويقع تحت سيطرة ظاهرة التحسس بالاضافة الى ان انتاج لكتين A يعتمد على العامل سكما في انزيم البلمرة (27)، اضافة الى العناصر

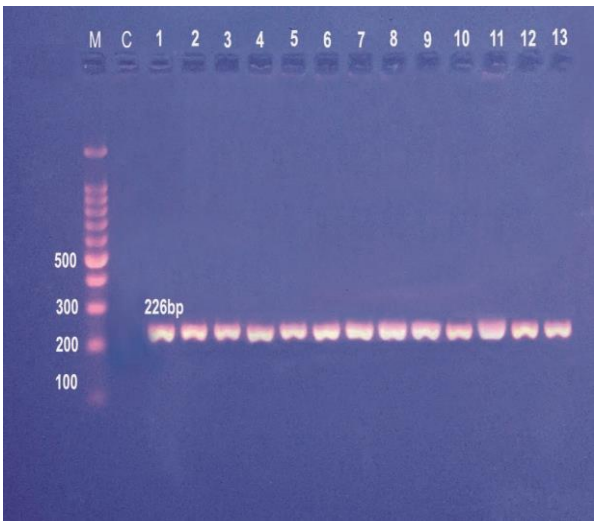
المنظمة بعد الاستنساخ (28) . فسر الباحث (29) ان التعبير الجيني للكتينA يعتمد على الكثافة العددية للزوائف الزنجارية . يعتبر جين *MvaT* المنظم للتعبير الجيني لعوامل الضراوة وله دور مهم في تنظيم التعبير عن لكتين A حيث ان الطفرة في هذا الجين المنظم يؤدي الى تعزيز التعبير عن لكتين A، كما ان اضافة N-acyl-L-homoserinelactons(AHLs) من مصدر خارجي تعزز التعبير الجيني (27) .



الشكل (2) الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل البلمرة المتسلسل لسلسلة الدنا باستعمال البادئ *LecA* على وسط هلام الأگاروز بتركيز 1.5 % M : الدليل الحجمي 100 زوج قاعدي، C معامل السيطرة السالبة، (1 – 18) أرقام العزلات لبكتريا *P. aeruginosa* :

الكشف عن جين *LecB*

اظهرت نتائج الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل البلمرة المتسلسل لجين *LecB* باستخدام البواديء المحددة لهذا الجين على هلام الاكاروز حزم ضمن الحجم المتوقع للجين (226 زوج قاعدي) ولجميع العزلات الشكل (3) . اتفقت هذه النتائج مع(6) الذي اشار لوجود الجين في جميع العزلات المدروسة . فسر (30) ان وجود الجين في بعض العزلات ولكن لم يتم التعبير عنه وحدوث التلازن يعود الى الطفرة في الجين نفسه فعند مقارنة العزلات البرية مع العزلات الطافرة لهذا الجين وجد ان العزلات البرية اعطت تلازناً قوياً بالمقارنة مع العزلات الطافرة، او الى الطفرة في جين *OprF* الذي يشفر لبروتينات الغشاء الخارجي التي تساعد في ارساء وتثبيت بروتين لكتينB على الغشاء وبذلك لايمكن الكشف عنه .



الشكل (3) الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل البلمرة المتسلسل لسلسلة الدنا باستعمال البادئ *LecB* على وسط هلام الأگاروز بتركيز 1.5 % M : الدليل الحجمي 100 زوج قاعدي، C معامل السيطرة السالبة، (1 – 13) أرقام العزلات لبكتريا *P. aeruginosa*.

المصادر

1- Streeter, K. and Katouli, M. (2016). *Pseudomonas aeruginosa*: A review of their Pathogenesis and Prevalence in Clinical Settings and the Environment . Infect Epidemiol Med. 2(1): 25-32.

2- Gale, T. (2012). *Pseudomonas* infection. Book rage. Inc.

3- Fricks-Lima, J.، Hendrickson, C.M.، Allgier, M.، Zhuo, H.، Wiene-Kronish, J.P.، Lynch, S.V. and Yang, K. (2012). Differences in biofilm formation and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from airways of mechanically ventilated patients and cystic fibrosis patients.J.Antimicrob Agents,37(4):309-315.

4- Hsueh, P.P. ; Chen, W.H. and Luh, K.T. (2005). Relationships between antimicrobial use and antimicrobial resistance in Gram-Negative bacteria causing nosocomial infection from 1991-2003 at a University hospital in Taiwan .Int .J. Antimicro. Agents., Nov.6.

5- Boukerb, A.M.، Rousset, A.، Galanos, N.، Méar, J. B.، Thépaut, M.، Grandjean, T.، Gillon, E.، Cecioni, S.، Abderrahmen, C.، Faure, K.، Redelberger, D.، Kipnis, E.، Dessein, R.، Havet, S.، Darblade, B.، Matthews, S.E.، deBentzmann, S.، Guéry, B.، Cournoyer, B.، Imberty, A. and Vidal, S. (2014). Antiadhesive properties of glycoclusters against Pseudomonas

aeruginosa lung infection. J. Med. Chem. 57, 10275–10289.

6- Winzer, K.، Falconer, C.، Garber, N.C.، Diggle, S.P.، Camara, M. and Williams, P. (2000). The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-IIL are controlled by quorum sensing and by RpoS, J. Bacteriol. 182,6401–6411.

7- Tielker, D. ; Hacker, S. ; Loris, R. ; Strathmann, M. ; Wingender, J. ; ilhelm, S. ; Rosenau, F. and Jaeger, K. E. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. Microbiology, 151: 1313–1323.

8- Hachem, R.Y. ; Chemaly, R.F. ; Ahmar, C.A. ; Jiang, Y. ; Boktour, M.R. ; Rjaili, G.A. ; Bodey, G.P. and Raad, I.I. (2007). Colistin is effective in treatment of infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in cancer patients". Antimicrob. Agents Chemother., 51 (6): 1905–1911.

9- Collee, J.G. ; Fraser, A.G. ; Marmion, B.P. and Simmons, A. (1996). "Mackie and McCartney Practical Medical Microbiology". 14th ed., Churchill Livingstone, New York, pp. 413-423.

10- Vandeppitt, J. ; Engbaek, K. ; Piot, P. and Heuch, C.C.(1991).Basik laboratory procedures in clinical Bacteriology.WHO.Geneva، Switzerland.

11- Brooks, C.F. ; Carrol, K.C.; Butel, J.S. and Mores, S.A. (2007). JawetzMelnick– and Adelerg Medical Microbiology 24th ed. McGraw- Hill. U.S.A.

12- محسن، مسلم عيدان .(2010). دراسة تأثير الفوسفات في ضراوة بكتريا الزوائف الزنجارية خارج وداخل الجسم الحي . رسالة ماجستير. كلية العلوم . جامعة الكوفة .

13- Bouhr، D.D.، Jenkins, S.I. and Wright، G.D. (2003). The moleculer basis of the expansive substrate specificity of the antibiotic resistance enzyme aminoglycoside acetultransferase . J. Bio. Chem. 278 : 12873 - 12880.

14- الكعبي، مروة حسن عبد علي .(2011) . تشخيص جينات CTX–M–III ،CTX–M–I ،bla SHV / blaTEM باستخدام تقنية التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا من بعض البكتريا السالبة لصبغة كرام . رسالة ماجستير. كلية العلوم – الجامعة المستنصرية .

15- Abdul Kahaleq, M.A.، Abu-Raghif, A.R.، Kadhim, S.R. (2015). Antibacterial activity of Fenugreek essential Oil against *Pseudomonas aeroginosa*: In vitro and in vivo Studies .Iraqi JMS; Vol.13(3) 1681-6579.

16- الجبوري، رسمية عمر سلطان .(2000) . التحري عن إنزيمات البيتا لاكتاميز لعدد من الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام المعزولة سريريا وتأثير بعض المركبات الكيمياوية المحضرة على هذه الجراثيم . رسالة ماجستير. كلية العلوم . جامعة الموصل.

17- عبد الله، رنا مجاهد و مهدي، عباس فالح. (2016) . تشخيص بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* باستخدام جين *16Sr DNA* . مجلة مركز بحوث التقانة الاحيائية . 1(10) 45-49 .

18- AL-Salihi, S.S. and Hameed, B.H. (2014) . Antibiosis resistant of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different clinical specimens . 9(2): (15-28) .

19- المشهداني، احمد محمد يوسف ياسين . (2016) التباين المظهري والجزيئي لبعض الجينات الخاصة بالضراوة والصفات التشخيصية للعزلات المرضية للزوائف الزنجارية . رسالة ماجستير . كلية العلوم . جامعة الانبار .

20- Schweizer, H.P. (2003) . Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria : Unanswered questions . Genet. Mol . Res . 2(1) : 48 – 62 .

21- AL-Kaisse, A.A. AL-Thwani, A.N. and AL-Segar, R.Q. (2015) . Incidence and Antibiotics Sensitivity of Multidrug-Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Burns Patients and Environmental Samples from Three Hospitals in Baghdad . Journal of Biotechnology Research Center Vol. 9 No.2.

22- Tenover, F. (2006) . Mechanism of Antimicrobial Resistance، centers for disease control and prevention Atlanta, Georgia, USA Vol 119(6A), 53-510.

23- AL-Saimary, E.، ALabbasi, M.، and Najim, M. (2010). Impact of multi drug resistance bacteria on the Pathogenesis of chronic Suppurative otitis media، Academic Journal،Vol.4،No.: 13، page 1373-1382 .

24- Ahmadi, K. ، Hashemian, A.M.، Bolvardi, E. and Hosseini, P. k. (2016). Vancomycin-

activator GacA in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Fems Microbiology Letters 200: 73-78.

29- Diggle, S.P.، Winzer, K.، Chhabra, S.R.، Worrall, K.E.، C.mara, M.، and Williams, P. (2003). The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates *rhl* dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. MolMicrobiol50: 29-43.

30- Funken, H.، Bartels, K.، Wilhelm, S.، Brocker, M.، Bott, M.، Bains, M.، Hancock, R.E.W.، Rosenau, F. and Jaeger, K. (2012). Specific Association of Lectin LecB with the Surface of *Pseudomonas aeruginosa*: Role of Outer Membrane Protein OprF. PLOS ONE. 7 (10): e46857 .

Resistant *Pseudomonase aeroginusa* in the Cases of Trauma. Medical Archives, 70(1):57-61.

25- Al-Daraghi, W.A. and Husamuldeen, Z. (2013). Detection of ExotoxinA gene in *Pseudomonas aeruginosa* from clinical and environmental samples . J. Al-Nahrain vol. 16(2): 56- 58.

26- Veeresh, B.، Adarsh, G.، Ramesh, T. and Ramesh, M. (2012) . Expresssion and purification of lectin A from *Pseudomonas aeruginosa* in *E. coli* . International Journal of Bioassays . 01 (12): 196-199 .

27- Diggle, S.P.، Winzer, K.، Lazdunski, A.، Williams, P.، and mara, M. (2002). Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of *N*-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression. *JBacteriol*184: 2576-2586.

28- Pessi, G.، and Haas, D. (2001). Dual control of hydrogen cyanide biosynthesis by the global

Molecular identification of *Pseudomonas aeruginosa* lectins (*LecA* and *LecB*) by using polymerase chain reaction

Ahmed N. Hami **Safaa A. Lateef Al Maeny** **Mohamed I. Nader**

Email: hanata_1987@yahoo.com

Abstract

One hundred fifty-two (152) clinical samples included burns, otitis, and wounds samples and were collected from some Baghdad hospitals. About cystic fibrosis samples, 6 samples were obtained from postgraduate students in Institute of Genetic Engineering. Also, 67 environmental samples were collected. After isolation and identification, 83 isolates of *Pseudomonas aeruginosa* had been identified. Fifty-four (54) isolates, includes 44 clinical isolates and 10 eco isolates, were selected to investigate the Susceptibility Test toward 11 types of antibiotics. 35 isolates were selected for the discovering tests of *16S rRNA*، *LecA* and *LecB* gene. Indeed, the bacterial isolates exhibited a high resistance against Ampicillin, Amoxicillin and Nalidixic acid; then decreased against Cefotaxime, Ceftazidimim, Tetracycline, Amikacin, Augmantin, Vancomycin, and Chloramphenicol, while the antibiotic Imipenem recorded a low resistance . The results of electrophoresis for PCR productions of gene *16S rRNA*, which considered identification gene, showed peaks in the suspected size (956 bp) in all clinical and environmental isolates. The results of electrophoresis for the detection of *LecA* gene، *LecB* bands in the size of (369 and 226 base pairs) respectively for all isolates . From another hand, these results showed peaks for *LecA* and *LecB* genes with sizes 369 and 226 pb respectively for all clinical and environmental isolates.