P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) **مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة** Open Access
2016,10 (3) :47-56

التشخيص الجزيئي للجينات *tox A* و *las B* في بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من مصادر سريرية مختلفة.

محمد ابراهيم الطائي* **جمال عبد الرحمن الحديثي**** **وسام كريم السويداوي****

*جامعة بغداد – معهد الهندسة الوراثية والتقانات الاحيائية

**جامعة الانبار – كلية التربية للعلوم الصرفة

معلومات البحث:
تاريخ التسليم:2017/02/21
تاريخ القبول: 2017/04/05
تاريخ النشر: 27/ 12 / 2017
DOI: 10.37652/juaps.2016.135141

الكلمات المفتاحية:
***P.aeruginosa* بكتريا,**
***16SrDNA* جين,**
***tox A* جين,**
***las B* جين.**

الخلاصة:

تعد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* واحدة من الممرضات الانتهازية القادرة على اصابة جميع انسجة الجسم تقريبا نتيجة لامتلاكها مجموعة متنوعة من عوامل الضراوة والتي تسهم بشكل كبير في احداث الامراضية لدى المضيف. تم في هذه الدراسة جمع 90 عينة تعود لمصادر سريرية مختلفة, للكشف عن انتشار بكتريا *P.aeruginosa* في هذه المصادر ودراسة بعض جينات عوامل الضراوة التي تمتلكها هذه البكتريا. شخصت العزلات النامية بعد زرعها على الاوساط الزرعية المختلفة من خلال الصفات المظهرية والمجهرية والزرعية فضلا عن التشخيص الجزيئي كتشخيص نهائي للعزلات النامية باستخدام جين التشخيص *16SrDNA* ذي التتابع الخاص ببكتريا *P.aeruginosa*. اظهرت نتائج التشخيص ان 47 /90 عزلة اي بنسبة (52%) تعود للنوع *P.aeruginosa* من مجموع العينات السريرية توزعت بين 15 عزلة (31.9%) من اخماج الحروق, 13 عزلة (27.6%) من اخماج الجروح, 10 عزلات (21.3%) من اخماج الاذن الوسطى, 5 عزلات (10.7%) من التليف الكيسي, 4 عزلات (8.5%) من اخماج المجاري البولية. تم التحري عن نسبة انتشار جين *tox A* المشفر للذيفان الخارجي Exotoxin A, وجين *las B* المشفر لأنزيم الايلاستيز Elastase باستخدام تقنية (PCR), اذ بينت النتائج وجود كلا الجينين بنسبة 100% ضمن الهيكل الوراثي لعزلات بكتريا *P.aeruginosa* قيد الدراسة, وبالرغم من وجودها العالي في جميع العزلات المدروسة لا يمكن اعتمادها كمؤشرات تشخيصية لهذه البكتريا كبدائل لجينات تشخيصية اخرى نظرا لحساسيتهما القليلة, فضلا عن كونهما من اكثر الجينات عرضة للطفرات

المقدمة:

تعد بكتريا الزوائف الزنجارية *P.aeruginosa* من الممرضات الانتهازية الشائعة, وهي بكتريا عصوية الشكل سالبة لملون كرام, تعود لعائلة Pseudomonadaceae, وهي مسؤولة عن 8-16% من عدوى المستشفيات **[1]** .

تتواجد الزوائف الزنجارية *P.aeruginosa* في البيئات الرطبة والدافئة على وجه الخصوص, ويمكن ان تكون معزولة من مختلف المصادر الحية بما في ذلك النباتات والحيوانات والبشر, ومصادر التربة , الماء, والغذاء ويعود سبب انتشارها الواسع في مختلف البيئات وقدرتها على احداث الاصابات الشديدة الى قدرتها على البقاء عند الحد الادنى من الاحتياجات الغذائية ومقاومتها لمختلف الظروف البيئية والمضادات

* Corresponding author at: University of Baghdad - Institute of Genetic Engineering and Biotechnology.
E-mail address

الحيوية وذلك لما تتمتع به من خصائص ايضية وانزيمية متنوعة **[2].** وهذه البكتريا نادرا ما تسبب الاصابة عند الاشخاص الاصحاء حيث تشكل خطرا كبيرا على المرضى الراقدين في المستشفيات لأنها تعتبر احد اهم الانواع البكتيرية المسببة لما يعرف بالإصابات المكتسبة في المستشفيات **[4,3]** وقد اشارت احصائيات مركز السيطرة على الامراض العالمي والوقاية منها Centers for Disease Control (CDC) الى ان بكتريا *P.aeruginosa* هي رابع الانواع البكتيرية الاكثر انتشارا والمعزولة من مختلف الامراض المكتسبة في المستشفيات **[5]**.تقوم بكتريا الزوائف الزنجارية بكسر دفاعات المضيف وتسبب بذلك العديد من الامراض متمثلة باخماج الجهاز التنفسي واخماج الحروق والجروح واخماج العين واخماج الجلد والمجاري البولية والاذن الوسطى وتجرثم الدم واخماج العظام والمفاصل واخماج الجهاز الهضمي **[6]** فضلا عن الاصابات الجهازية الاخرى لاسيما عند الاشخاص الذين يعانون من حروق شديده والسرطان والايدز اذ ان ضعف الجهاز المناعي يؤدي الى استفحال الاصابة وبالتالي موت المريض**[7]** .

تمتلك بكتريا *P.aeruginosa* مجموعة كبيرة ومتنوعة من عوامل الضراوة والتي تفرز منها خارج الخلية والتي قد تسهم في تحقيق الامراضية لهذه البكتريا وقد تمثلت هذه العوامل بالذيفان الخارجي Exotoxin A (ETA), اذ يعد من البروتينات عالية السمية و احد العوامل شديدة الضراوة اذ تعود اليه بعض حالات الوفاة عند افرازه من قبل بكتريا *P.aeruginosa* وتكمن خطورة هذا الذيفان البروتيني بإيقافه لعملية تصنيع البروتينات عند دخوله الى سايتوبلازم الخلايا حقيقية النواة وذلك عن طريق الجزء البروتيني للذيفان ذي الوزن الجزيئي 37 كيلو دالتون والذي يعمل على المادة الاساس المتمثلة بعامل الاستطالة Elongation factor 2 والذي يحفز بدوره خطوة انتقال الرايبوسوم Translocation من شفرة الى اخرى خلال عملية تصنيع البروتينات في الخلايا الحقيقية. فعند انتقال الذيفان الخارجي ETA الى السايتوبلازم يقوم بتحفيز تحليل مكرب النيكوتين امايد ادنين ثنائي الفوسفات NAD ونقل جزيئة ADP-Ribosyl من NAD الى العامل EF2 وبذلك يمنع استطالة سلسلة البروتين على الرايبوسوم, وبذلك فان للذيفان الخارجي الية مشابهه لعمل ذيفان الخناق Diphtheria toxin ولكن الاختلاف يقتصر فقط على المستقبلات الخاصة بكل منهما والمنتشرة على سطح الخلية**[8]**. فضلا عن امتلاك بكتريا *P.aeruginosa* لعامل ضراوة اخر لا يقل خطورة عن الذيفان الخارجي (ETA) والمتمثل بأنزيم الايلاستيز, اذ يقوم هذا الانزيم بتحطيم بروتين الايلاستين الذي يعد من المكونات المهمة للأوعية الدموية في الانسان والمسؤول عن مرونتها, وكذلك ان الايلاستين يعد من المكونات الرئيسة للرئة والمسؤول عن عملية التمدد والتقلص الخاص بها, لذلك فان هذا الانزيم له دور مهم في تحديد ضراوة بكتريا *P.aeruginosa* خلال وقت الاصابة**[9]**.ومما يزيد من ضراوة هذا الانزيم هو تفاعله مع بروتينات نظام الدفاع المناعي البشري وتحليلها لاسيما كريات الدم البيضاء المتعددة الانوية, الخلايا القاتلة الطبيعية, والاضداد المناعية من نوع IgA, IgG وبذلك تعد سلالات الزائفة الزنجارية المنتجة لهذا الانزيم من اقوى المثبطات المناعية مما يجعل الجسم اكثر عرضة للإصابة بالكائنات الحية الدقيقة الاخرى**[10]**.

في هذه الدراسة كان الهدف هو التحري عن انتشار الجين المشفر للذيفان الخارجي (ETA) والمتمثل بالجين *tox A*, والجين المشفر لأنزيم الايلاستيز Elastase والمتمثل بالجين *las B* في بكتريا *P.aeruginosa* ضمن الهيكل الوراثي للعزلات السريرية المستحصل عليها من حالات

مرضية مختلفة, وعلاقتهما بالفوعة العالية التي تتميز فيها هذه البكتريا, وتقييمهما كبديل ناجح وسريع لتشخيص بكتريا *P.aeruginosa* ضمن المصادر المختلفة.

المواد وطرائق العمل:

عزل وتشخيص بكتريا *P.aeruginosa*

تم جمع 90 عينة من مصادر سريرية مختلفة خلال الفترة من 20 كانون الاول لسنة 2015 ولغاية 10 شباط لسنة 2016 وكما موضح في الجدول (1-1).

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

ت	نوع العينة	المصدر	المكان الذي استحصلت منه	العدد
1	سريرية	خمج الحروق	مستشفى الحروق/ مدينة الطب	33
2	سريرية	خمج الجروح	مستشفى اليرموك التعليمي	22
3	سريرية	خمج الاذن الوسطى	المختبرات التعليمية / مدينة الطب	17
4	سريرية	التليف الكيسي	طلبة دراسات / معهد الهندسة الوراثية	7
5	سريرية	خمج المجاري البولية	مستشفى الكرامة التعليمي	11
العدد الكلي للعينات السريرية 90 عينة				

تشخيص العزلات:

شخصت العزلات البكتيرية من خلال ملاحظة قدرتها على النمو على العديد من الاوساط الزرعية التشخيصية والمتمثلة بوسط اكار المكونكي MacConkey agar, وسط اكار السيدوموناس Pseudomonas agar, وسط اكار الستريمايد Cetrimide agar و وسط اكار الكرومايجين اورنتشن CHROM agar orientation وتم ملاحظة التغيرات التي احدثتها المستعمرات النامية على تلك الاوساط ودراسة صفاتها المظهرية من حيث شكل, حجم, ولون المستعمرات النامية **[11]**, فضلا عن الاختبارات البايوكيميائية والمتمثلة باختبار Oxidase و Catalase واختبارات IMVC وتم تأكيد التشخيص باستعمال نظام API- 20E للتأكيد النهائي لعزلات بكتريا *P.aeruginosa* وحسب تعليمات الشركة المصنعة.

استخلاص الدنا البكتيري:

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

تحضير البادئ:

حضرت محاليل البوادىء المبينة في الجدول (1- 2) وبشكل منفصل بتركيز 10 بيكو مول/ مايكروليتر وذلك بأخذ 10 مايكروليتر من المحلول الخزين لكل بادئ واضافته الى 90 مايكروليتر من الماء المقطر اللايوني ومزج جيدا وحفظ في الثلج لحين الاستعمال في حين حفظت المحاليل الخزنية Stock للبوادىء في درجة حرارة −20 م مع مراعاة مزج المحلول بعد اخراجه من الثلج باستعمال المازج Vortex لمجانسته قبل الاستعمال**[12]**.

جدول (1-2): البوادىء المستخدمة في هذه الدراسة.

Primer Name	Orientation	Primer sequences (5-3)	AT (°C)	Product size(pb)
16SrDNA	F	5́- GGGGGATCTTCGGACCTCA-3́	58	956 bp
	R	5́- TCCTTAGAGTGCCCACCCG-3́	58	
tox A	F	AAC CAG CTC AGC CAC ATGTC-5́-3´	55	208 bp
	R	5́- CGC TGG CCC ATT CGC TCC ACC GCT-3´	55	
las B	F	-GGAATGAACGAAGCGTTCTC-3´ 5́	55	300 bp
	R	GGTCCAGTAGTAGCGGTTGG-5́-3´	55	

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

حظر خليط PCR من *GO Taq* Green Master Mix والمجهز من قبل شركة Promega USA وبحجم 12.5 مايكروليتر, 1 مايكروليتر من F-Primer, 1 مايكروليتر من R-Primer, 2 مايكروليتر من الدنا القالب template DNA و8.5 مايكروليتر من الماء المقطر اللأيوني المعقم والمجهز من قبل شركة Promega (USA) حيث اصبح الحجم النهائي لمزيج التفاعل 25 مايكروليتر, بعد ذلك مزجت محتويات انابيب PCR جيدا باستعمال المازج ثم وضعت في جهاز PCR وحسب البرنامج الخاص بجين *16SrDNA* الذي ورد في **[13]** مع اجراء بعض التحويرات على برنامج PCR للوصول الى البرنامج الامثل Optimization program للحصول على المنتج وكما موضح في جدول (1-3).

جدول (1-3): برنامج PCR الخاص بتضخيم جين *16SrDNA* لبكتريا *P. aeruginosa*.

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

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

الكشف الجيني عن الجينات *tox A* و *las B* المشفرة لبعض عوامل الضراوة باستعمال تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR):

حظر خليط PCR من *GO Taq* Green Master Mix والمجهز من قبل شركة Promega USA للجين المشفر للذيفان الخارجي **ETA** والمتمثل بجين ***tox A***, والجين المشفر لأنزيم الايلاستيز والمتمثل بجين ***las B*** بنفس الطريقة التي حضر منها خيط التفاعل للجين *16SrDNA* وبحسب البرنامج المذكور لكلا الجينين في الجدول (1-4).

جدول (1-4): برنامج PCR المستخدم في تضخيم الجينات (*tox A* , *las B*) والمتخصصة كأحد عوامل الضراوة في بكتريا *P. aeruginosa*:

Primer		1 cycle	30 cycle			1cycle	H.T
		Initial denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Final Extension	
		Time=180sec	Time=30sec	Time=1min	Time=1min	Time=300sec	180 sec
tox A		Temp=94˚C	Temp=94˚C	Temp=55˚C	Temp=72˚C	Temp=72˚C	4 ˚C
las B		Temp=94˚C	Temp=94˚C	Temp=55˚C	Temp=72˚C	Temp=72˚C	

بعد عملية تضخيم الجينات بوساطة تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR, تم اخذ 5 مايكروليتر من ناتج التفاعل بوساطة ماصة دقيقة وحمل الناتج الخاص بكل جين في حفر الترحيل الكهربائي مع الواسمات القياسية للدنا DNA ladder 100 bp وبعد انتهاء تحميل العينات في الهلام الذي تكون من أكاروز بتركيز 1.5% الذائب بحجم 100 مللتر من محلول TBE Buffer 1X, رحلت العينات كهربائيا بفرق جهد مقداره 70V لمدة 90 دقيقة وبعد الانتهاء من عملية الترحيل نقل القالب لفحص الهلام بتعريضه الى مصدر للأشعة فوق البنفسجية عند طول موجي (340) نانوميتر لغرض تحديد حجوم الجينات المدروسة اعتمادا على الواسمات القياسية **[14]**.

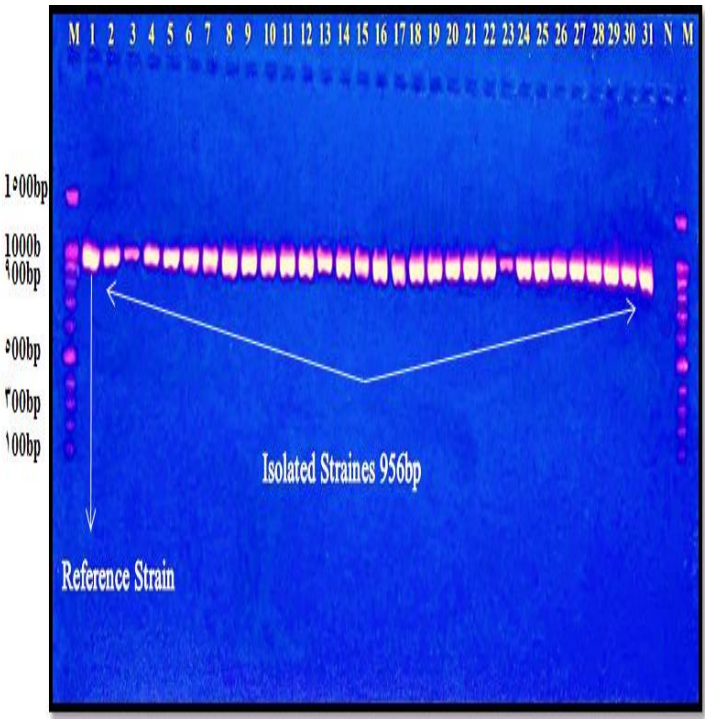
النتائج والمناقشة:

بعد اجراء الخطوات اللازمة لتشخيص بكتريا *P.aeruginosa* من العينات الدراسية المستحصل عليها والمتضمنة كل من الاختبارات المزرعية والكيميائية والجزيئية اللازمة للتشخيص, تم الحصول على 47 عزلة تعود لبكتريا *P.aeruginosa* من اصل 90 عينة تم الحصول عليها من مصادر سريرية مختلفة اذ يوضح الجدول (1-5) عدد العزلات والنسب المئوية موزعة حسب مصادر العزل.

جدول (1-5): اعدادا ونسب عزلات بكتريا *P.aeruginosa* موزعة حسب مصادر العزل.

ت	مصادر العزل	العدد الكلي للعينات	عدد عزلات بكتريا *P.aeruginosa*	النسبة المئوية %	
				نوعي[1]	اجمالي[1]
1	الحروق Burn	33	15	31.9	16.6
2	الجروح Wound	22	13	27.6	14.4
3	التهابات الاذن الوسطى	17	10	21.3	11.1
4	التليف الكيسي	7	5	10.7	5.5
5	التهاب المجاري البولية UTI	11	4	8.5	4.4
	العدد الكلي	90	47	100	%52

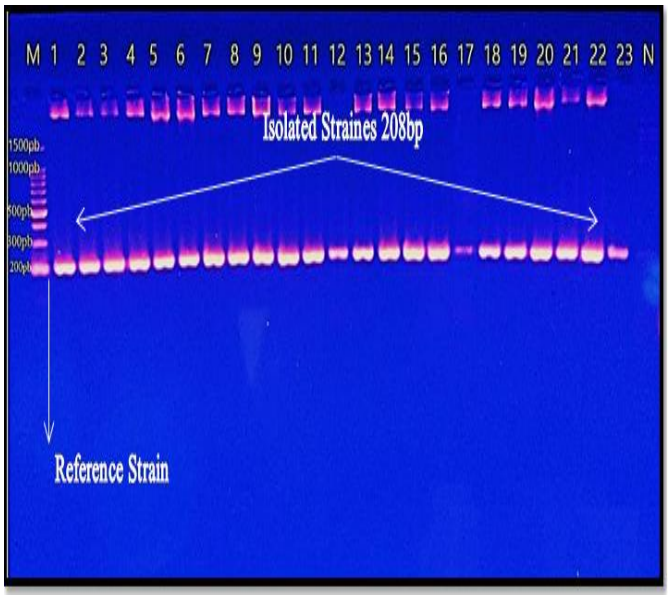
تمت عملية استخلاص الدنا البكتيري من جميع العزلات المشخصة بوساطة الاختبارات المزرعية والبايوكيميائية, وتم الكشف عن وجود الجين *16SrDNA* ضمن الهيكل الوراثي لتلك العزلات والذي يعد من الجينات التي يعتمد عليها في التشخيص الدقيق لبكتريا *P.aeruginosa* بوساطة تقنية PCR, اذ بينت نتائج الكشف عن الجين ان جميع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



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

المسار M يمثل الدليل الحجمي 100 زوج قاعدي, المسارات (1-31) ناتج التضخيم للجين 16SrDNA لعزلات بكتريا P.aeruginosa المختلفة.

تم التحري عن وجود بعض جينات الضراوة والمتمثلة بالجين *tox A* المشفر للذيفان الخارجي (ETA), والجين *las B* المشفر لأنزيم الايلاستيز ضمن الهيكل الوراثي لعزلات بكتريا *P.aeruginosa* المستحصل عليها من اماكن سريرية مختلفة اذ بينت نتائج (PCR) المستحصل عليها بعد اتمام عملية الترحيل الكهربائي ان جميع العزلات تمتلك كلا الجينان ضمن هيكلها الوراثي وبنسبة 100% بالرغم من اختلاف مصادر الحصول على العزلات وكما موضح في الشكل (2) و(3).

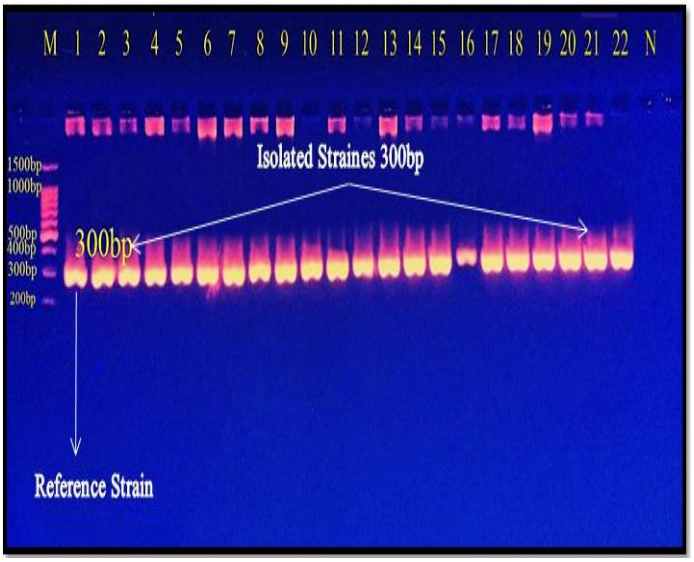


شكل (2): الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لعزلات بكتريا *P.aeruginosa* باستعمال البادئ النوعي للجين *tox A* (208 زوج قاعدي) على هلام الاكاروز بتركيز 1.5% وفرق جهد 70 فولت / لمدة 90 دقيقة.

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

المسار (1) يمثل ناتج التضخيم للجين *tox A* للعزلة القياسية ATCC 27853.

المسارات (2- 23) تمثل ناتج تضخيم الجين *tox A* لعزلات بكتريا *P.aeruginosa* المختلفة.



شكل (3): الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لعزلات بكتريا *P.aeruginosa* باستعمال البادئ النوعي للجين *las B* (300 زوج قاعدي) على هلام الاكاروز بتركيز 1.5% وفرق جهد 70 فولت / لمدة 90 دقيقة.

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

المسار (1) يمثل ناتج التضخيم للجين *las B* للعزلة القياسية ATCC 27853.

المسارات (2- 22) تمثل ناتج تضخيم الجين *las B* لعزلات بكتريا *P.aeruginosa* المختلفة.

تعد بكتريا *P.aeruginosa* من الممرضات الانتهازية والمسؤولة عن عدد كبير من الامراض المكتسبة داخل المستشفيات وقد عزلت من عدد كبير من الحالات المرضية المختلفة لاسيما الحروق, والتهابات ما بعد العمليات الجراحية**[15]** . بينت نتائج الدراسة الحالية ان اعلى نسبة للعزلات قيد الدراسة كانت من الحروق اذ بلغت نسبتها 47/15 (31.9%) تلتها الجروح بنسبة 47/13 (27.6%), وقد اتفقت نتيجة الدراسة مع النتيجة التي حصل عليها **[16]** اذ وجدوا ان بكتريا *P.aeruginosa* تعد من اكثر الانواع البكتيرية المسببة لإصابات الحروق والجروح والاكثر ترددا من بين الاصابات الاخرى في المستشفيات التي تسببها هذه البكتريا. اما نسبة الاصابة باخماج الاذن الوسطى فقد حلت بعد اخماج الجروح وبنسبة 47/10 (21.3%), وهذه النتيجة جاءت مقاربة مع ما حصلوا عليه **[17]**اذ كانت نسبة العزل في دراستهم (12%) من حالات خمج الاذن الوسطى, في حين كانت نسبة الاصابة باخماج المجاري البولية 47/4 (8.5%) وهذه النتيجة اتفقت مع النتيجة التي حصل عليها **[18]** حيث كانت نسبة العزلات المستحصل عليها في دراسته من اخماج المجاري البولية (5.7%), ويعود سبب انخفاض نسبة هذه العزلات الى قلة عدد العينات المستحصل عليها من المرضى الخاضعين لعملية القسطرة او الى الممارسات الصحيحة في التعقيم من قبل المستشفيات.

بينت نتائج التشخيص الجزيئي لبكتريا *P.aeruginosa* باستخدام الجين *16SrDNA* ان جميع العزلات تمتلك هذا الجين ضمن هيكلها الوراثي وبنسبة 100%, اتفقت النتيجة المستحصل عليها مع ما ذكره **[19]** خلال دراستهم في تشخيص بكتريا *P.aeruginosa* عن طريق جين *16SrDNA*, حيث وجدوا ان التشخيص باستعمال جين *16SrDNA* يعد من التشخيصات الدقيقة لبكتريا *P.aeruginosa* وللأنواع الاخرى وذلك لأن له تسلسل ثابت لكل نوع من الانواع البكتيرية ونظرا لثبات تسلسلات هذا الجين لعب دورا عالي الاهمية في التصنيف للأحياء البدائية والتشخيص الجزيئي. وبذلك, يعد جين *16SrDNA* البديل الناجح في تشخيص الاحياء المجهرية الدقيقة كبديل سريع مقارنة بالأساليب المظهرية التي استخدمت سابقا بشكل واسع على النطاق المختبري**[20].**

بينت نتائج التحري عن الجين *tox A* المشفر للذيفان الخارجي (ETA) بوساطة تقنية (PCR) ان جميع العزلات السريرية المدروسة تمتلك الجين *tox A* ضمن هيكلها الوراثي وبنسبة 100%, اتفقت هذه النتيجة مع النتيجة التي حصلوا عليها **[21]** اذ وجدوا ان جميع عزلات بكتريا *P.aeruginosa* المعزولة من مصادر سريرية مختلفة تمتلك الجين *tox A* وبنسبة (100%), في حين لم تتفق نتيجة الدراسة مع ما حصلا عليه **[22]** خلال دراستهما في الكشف عن الجين *tox A* في بكتريا *P.aeruginosa* المعزولة من مصادر سريرية وبيئية مختلفة تمثلت بالجروح, الحروق, التهاب القناة الرئوية, التهابات المجاري البولية, الماء, والتربة اذ وجدا ان عزلة واحدة من بين 100 عزلة تمتلك هذا الجين ضمن محتواها الوراثي وقد أشارا الى أن سبب ذلك قد يرجع الى إعادة ترتيب التتابعات الخاصة بهذا الجين أو الى غياب تتابعات هذا الجين في أغلب العزلات المدروسة, لذلك لم تنجح في تكوين المنتج خلال عملية (PCR).

يلعب الذيفان الخارجي A (ETA) دورا مهما دورا في عملية اختراق الانسجة لاسيما عند الاشخاص المصابين بالتليف الكيسي فضلا عن دوره في عملية تنخر الانسجة وخفض نشاط البلعمة وبخاصة عند الاشخاص الذين يعانون من حروق شديدة **[23],** وقد اشار عدد من البينات الى أن سلالات بكتريا *P.aeruginosa* التي تمتلك جين *tox A* ولها القدرة على انتاج الذيفان ETA تلعب دورا مهما في الفسيولوجيا المرضية من خلال تسببها في تسمم الدم والذي يؤدي الى موت العديد من مرضى الحروق**[24].**

كذلك بينت نتائج الكشف عن الجين *las B* المشفر لأنزيم الايلاستيز Elastase بوساطة تقنية (PCR) ان جميع العزلات السريرية تمتلك الجين *las B* ضمن هيكلها الوراثي وبنسبة 100%. اتفقت نتيجة الدراسة مع ما حصلوا عليه **[25]** فقد وجدوا ان جميع العزلات المستحصل عليها من مصادر سريرية مختلفة والمتمثلة بالحروق, الدم, والقناة الرئوية والتي بلغ عددها 30 عزلة كانت تمتلك الجين *las B* وبنسبة (100%), فيما لم تتفق نتيجة هذه الدراسة مع ما حصلت عليه **[26]** خلال دراستها على عدد من العزلات المحلية لبكتريا *P.aeruginosa* المعزولة من حالات التليف الكيسي اذ وجدت ان نسبة العزلات التي اعطت نتيجة موجبة لاختبار وجود الجين *las B* ضمن الهيكل الوراثي لتلك العزلات كانت (30.76%), واشار**[27]** خلال دراستهم على بكتريا *P.aeruginosa* الى ان غياب الجين *las B* من الهيكل الوراثي لأغلب العزلات المدروسة قد يكون حدثا نادرا. يلعب انزيم الايلاستيز دورا هاما في تحديد ضراوة بكتريا *P.aeruginosa* خلال فترة اصابة العائل من خلال نشاطه الحال لبروتين Elastin الذي يعد من

المكونات الرئيسية للأنسجة الرئوية والاوعية الدموية والمسؤول عن مرونتها, فضلا عن نشاطه تجاه البروتينات التركيبية للخلايا**[9],** وان انتشار جين *las B* في جميع العزلات السريرية والبيئية تنطوي على اهمية العامل المرتبط بهذا الجين في بقاء وانتشار بكتريا *P.aeruginosa* في مختلف البيئات.

بالرغم من الانتشار العالي لكلا الجينين *tox A* و*las B* في مختلف عزلات بكتريا *P.aeruginosa* السريرية الا انه لا يمكن اعتمادهما كمؤشرات تشخيصية لهذه البكتريا بسبب حساسيتهما القليلة واستعدادهما العالي للتعرض للطفرات.

المصادر:

1. Wargo, M. J. ; Gross, M. J.; Rajamani, S.; Allard, J. L. and Lundblad, L. K. A. (2011). Hemolytic Phospholipase C Inhibition Protects Lung Function during *Pseudomonas aeruginosa* Infection . *Respir Crit Care* Med , 184: 345-354.
2. Lister, P.D. ; Wolter, D.J. and Hanson, N.D. (2009) . Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* : clinical impact and complexregulation of chromosomally encoded resistance mechanisms . *Clinical Microbiology Reviews* . 22(4): 582-610 .
3. Hyeon**,** J.C. ; Kim, M.H. and Cho, M.S.(2013). Improved PCR for identification of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:3643–3651.
4. Vianelli**,** N.; Giannini, M.B and Quartic, C.(2006). Resolution of *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a haematology unit with the use of disposable sterile water filter. Haematol, J; 91(7):983-985.
5. Sivaraj, S.; Murugesan, P.; Muthuvelu, S. Purusothaman, S. and Silambarasan A.(2012). comparative study of pseudomonas aeruginosa isolate recovered from clinical and environmental samples against antibiotics. Int J Pharm Sci . 4(3):103-107.
6. Gale, T. (2012). Pseudomonas infection. Book rage. Inc.
7. Wijesinghe, L. P. and Weerasinghe, T. K. (2010). A Study on the Bactericidal Efficiency of Selecte Chemical Disinfectants and Antisepticsd . *OUSL Journal* , 6:44-58.
8. Xing, D. ; Youle, R. ; Fitzgerald, D. and Pastan, I. (2010) . *Pseudomonas* exotoxin A mediated apoptosis is bak dependent and preceded by the degradation of Mci-1 . *J. PMC.* 1: 1-9 .
9. Bai, F. ; Xu, H. ; Zhang, Q. ; Qi, X. ; Mou, R. ; Bai, G. and Qiao, M. (2011) . Functional characterization of pfm in protein secretion and lung infection of *Pseudomonas aeruginosa* . *Can. J. Microbiol.* 57: 829-837 .
10. Cotar, A. ; Chifiriue, M. ; Dinu, S. ; Bucur, M. ; Iordache, C. ; Banu, O. ; Dracea, O. ; Larion, C. and Lazar, V. (2010) . Screening of molecular virulence markers in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical infections . *Int. J. Mol. Sci*. 11: 5273-5291 .
11. Baron, E. J. ; Finegold, S. M. and Peterson, I. L. R. (2007) .Bailey and Scotts Diagnostic Microbiology. 9th ed. Mosby Company. Missouri.
12. Sonbol, F. I; Khalil, M. A. E.; Mohamed, A.B. and Ali, S.S. (2015). Correlation between antibiotic resistance and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Turkish J. of Med. Sci. 45: 568-577.
13. Spilker, T. ; Coenye, T. ; Vandamme , P. and Lipuma, J.J. (2004) . PCR based assay for differentiation of Pseudomonas aeruginosa from other Pseudomonas species recovered from cystic fibrosis patients. J. Clin. Microbiol . 42 (5): 2074-2079.
14. Janam, R. ; Gulate, A.K. and Nach, G. (2011) . Antibiogram and genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from human , animal , plant, water and soil sources in north India. Southeast. *Asian J. Trop. Med. Pub. Health*. 42(6):1477-1488 .
15. Kiffer **,** C.; Musiung, A.; Oplustil, C.; Sampaio, J.; Sakagami, E.; Turner, P. and Mends, C.(2005). Antimicrobial susceptibility of gram-negative bacteria in Brazilian hospital: the mystic program Brazil 2003. *Braz.j. infect*. Dis.9(3):216-224.
16. Abdulridha, S. and Alkaabi, G. (2012). Bacterial Isolates and Their Antibiograms of Burn Wound

Infections in Burns Specialist Hospital in Baghdad. *J. Baghdad for Sci*. 10(2): 331-340.

17. Abdullah, R.M.; Samaan, S.F. and AL-Shwaikh, A.M. (2010) . study the effect of antibiotic combination of beta – Lactam and amino glycoside with another group of antibiotics and their synergism effect. *Journal of Arab Board of Health specialization*. Vol.11, No.1.

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

19. Altaai, M.E. ; Aziz, I.H. and Marhoon, A.A. (2014) . Identification *Pseudomonas aeruginosa* by *16SrRNA* gene for differentiation from others *Pseudomonas* species that isolated from patients and environment . *J. Bagh. Sci.* 11(2): 1028-1034.
20. Pereira, F.; Carneiro, J.; Matthiesen, R.; van Asch, B.; Pinto, N.; Gusmao, L.; Amorim, A. (4 October 2010). "Identification of species by multiplex analysis of variable-length sequences". *Nucleic Acids Research* 38 (22): e203–e203.doi:10.1093/nar/gkq865.
21. Gupta, L.; Saroj, S. K. and Amir, A. (2015). Molecular detection of *Pseudomonas aeruginosa* from water samples collected from picnic spot, lucknow, by amplification of the exotoxin-A gene. International *Journal of Science Technology and Management*. 4(1):1537- 2394.
22. Al-Daraghi, W. A. and Abdullah, Z. H. (2013). Detection of Exotoxin A gene in Pseudomonas aeruginosa from clinical and environmental samples. Journal of Al-Nahrain University. 16 (2):167-172.
23. Pilla, C.M. and Hobden , J.A.(2003). Pseudomonas aeruginosa exotoxin a and keratitis in mice. Invest. Ophthalmol. 43(5): 1437-1444.
24. Bahaa EL-din, A.; EL-nagdy, M.; Badr, R. and EL-sabagh A.(2008). *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A : Its role in burn wound infection, and wound healing. *Egypt, J. Plast. Reconstr. Surg*. 32(1): 59-65.
25. Khattab, M. A. ; Nour, M. S. and Elsheshtawy, N. M.(2015). Genetic Identification of Pseudomonas aeruginosa Virulence Genes among Different Isolates . J Microb Biochem Technol. 7(5) : 274-277.
26. Garalla, E.T. (2015). Molecular analysis of some virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis and non-cystic fibrosis sources. Thesis University of Mustanslriyah , College of Science.
27. Finnan, S. ; Morrissey, J. P. ; O'Gara, F. and Boyd, E. F. (2004). Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients and the hospital environment. J. Clin Microbiol. 42: 5783–5792.

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2016,10 (3) :47-56

Genetic Diagnosis of *tox A* and *las B* Genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different clinical sources.

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

E.mail:

Abstract:

P.aeruginosa bacteria are opportunistic pathogens capable of infection almost every tissue in the body as a result of possessing a large variety of virulence factors which significantly contribute to the pathogenicity of the host events. In this study, the collection of 90 different clinical sample belonging to the sources, for detection the spread of *P.aeruginosa* in these sources and study some of virulence factors genes possessed by these bacteria. Diagnosed develop isolated after planted on different growth media through phenotypic traits and microscopic examinations, as well as molecular diagnostics definitive diagnosis of isolates that give a positive result as bacteria *P.aeruginosa* during the previous tests were depending on the gene diagnosis *16SrDNA* with a special bacterial sequence of *P.aeruginosa*. Diagnostic results showed that 47 isolated a 52% belonging for the type of *P.aeruginosa* that were divided on 15 isolates 31.9% of cases of burns infections, 13 isolates 27.6% of cases of wound infections, 10 isolates 21.3% of cases of middle ear infections, 5 isolates 10.7% of cystic fibrosis, 4 isolates 8.5% of cases of urinary tract infections. It has been investigating the prevalence of *tox A* gene that encoded to external toxin A (ETA), and *las B* gene that encoded to elastase enzyme using (PCR) technique, as the results showed the presence of both genes by 100% within the genetic structure of the isolates of *P.aeruginosa* under study, and despite the higher in all isolates studies cannot be adopted as indicators diagnostic of these bacteria as substitutes for other genes diagnostic because low sensitivity, as well as being the genes of the most prone to mutations.