# انتشار انزيماتOXA بيتا لاكتيميز في بكتريا *pseudomonas aeruginosa* في مدينة الديوانية

تاريخ الاستلام 2016/10/31 تاريخ القبول 2017/1/28

رنا مشعل سالم سيوف خومان علوان

Syoof.ALRamahi@qu.udu.iq

قسم علوم الحياة – كلية العلوم – جامعة القادسية

**ألخلاصه Abstract:**

تم في هذه الدراسه جمع 390عينه من مصادر مختلفة في مستشفى الديوانية التعليمي خلال المدة من شهر تشرين الثاني 2011 لغاية شهر آذار 2012 و كانت عملية جمع العينات بشكل عشوائـي لغرض معرفة بؤر التلوث بالزوائف الزنجاريه و شملت 292 عينة سريريه و 98 عينة بيئية. )، أظهرت نتائج الفحوص الزرعية والإختبارات الكيموحيوية عائدية 50 عزلة (39 عزلة مصدرها عينات سريريه و 11 عزلة مصدرها عينات بيئية) لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa.*وتم تأكيد تشخيصيها باستعمال 16s-ribosomal RNA اذ بينت الدراسة احتواء العُزلات جميعها على المورث 16s-ribosomal RNA التي تُمثّل المورثة التشخيصيّة المصممة في هذه الدراسة .

تم التحري عن قابلية هذه العزلات على إنتاج مجاميع انزيمات الـOXA بيتا لاكتاميز واسعة الطيف من خلال الكشف عن تواجد مـورثات $bla_{OXA-2}$, $bla_{OXA-1}$, $bla_{OXA-18}$, $bla_{LCR-1}$, $bla_{OXA-10}$ لدى تلك العزلات باستعمال تقنية سلسلة تفاعل إنزيم البلمرة [Polymerase chain reaction(PCR)]، إذ أظهرت 50/50 ( 100%) عزلة إحتوائها المورث $bla_{OXA-10}$ الذي ينتمي الى OXA group I ، وأشارت الدراسة الحالية إلى أنّ العزلات جميعها لم تعطِ ناتج تضخيم للموروثات $bla_{OXA-2}$, $bla_{OXA-1}$, $bla_{LCR-1}$, $bla_{OXA-18}$ وتعود الى المجاميع الرئيسة لانزيمات الـOXA بيتا لاكتاميز واسعة الطيف وهي OXAgroup II وOXAgroup III وOXAgroup V على التوالي باستثناء انزيم OXA18 فلا يعود الى اي من هذه المجاميع .

الكلمات المفتاحية : انزيمات الـOXA , *Pseudomonas aeruginosa* , بيتا لاكتيميز

*البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الاول

**ألمقدمه Introduction** :

تعد *P. aeruginosa* مسببات مرضية انتهازية Opportunistic pathogens نادراً ما تسبب المرض في الأشخاص ألأصحاء ولكنها تشكل خطراً حقيقا للمرضى الراقدين في ألمستشفيات وبشكل خاص مرضى ألسرطان وإصابات ألحروق ومرضى نقص ألمناعة وزراعة الأعضاء فهي واحدة من أهم الأنواع البكتيرية المسببة لما يعرف بالإصابة المكتسبة في المستشفيات (Nosocomial infections)، إذ يمكن لهذه البكتريا أن تنمو على أرضية ردهات المستشفى وصالات ألعمليات والأدوات الجراحية وغيرها، كما وتمتلك القدرة على البقاء في المواد المطهرة وبعض أنواع المعقمات(1) .

تسبب *P. aeruginosa* حالات مرضية مختلفة تكون موضعية ولاسيما بعد العمليات الجراحية وإصابات الحروق ثم تنتشر الإصابة وتسبب حالات تجرثم الدم ألمميت كما تسبب إصابات الجهاز البولي
(2). إنّ الإصابات الشديدة ببكتريا *P. aeruginosa* تكون بسبب قدرتها على استعمار مواقع تشريحية مختلفة (بسبب امتلاكها آليات التصاق فعالة ومتطلبات تغذية قليلة ومقاومة للمضادات الحيوية) ولها قدرة على غزو الأنسجة الموضعية وتحطيمها ولها ميل لغزو مجرى الدم وإحداث الأمراض الجهازية(3). و تفرز هذه البكتريا كثير من عوامل الضراوة التي تساعدها على الغزو والاستيطان وإحداث الضرر ألنسيجي وغزو مجرى ألدم والانتشار في مناطق الجسم المختلف( 4) . ومن أهم هذه العوامل الهيمولايسين أو حال ألدم وإنزيم الإيلاستيز وإنزيم اليوريز الذي يحلل ليوريا وغيرها من الإنزيمات (5) .

تمتلك بكتريا *P.aeruginosa* القدرة على مقاومة مدى واسع ومتنوع من المضادات ألحيوية الشئ الذي جعلها من بين أخطر وأهمّ المسببات للأمراض التي تصيب الإنسان(6) . إذ بإمكان هذه البكتريا استخدام آليات متنوعة في المقاومة، ومن أهم هذه الآليات انخفاض نفاذية الغشاء الخارجي، أو مضخات دفق متعددة العقاقير، أو إنتاج إنزيمات محطمة للمضاد الحيوي مثل إنزيمات β–lactamases والـ Cephalosproinases وإنّ إنتشار هذه البكتريا في مختلف مناطق الجسم، وتعرضها المستمر لمضادات الحياة، أدّى إلى نشؤ سلالات تمتاز بتعدد المقاومة للعقاقير (1). وتعتبر آلية إنتاج إنزيمات واسعة الطيف (Extended spectrum β– lactamases) والبيتالاكتاميز المعدنية (Metalo–β–lactamases) من أهم آليات المقاومة التي تم

اكتشافها في العصيات السالبة لصبغة غرام. وفي السنوات الأخيرة اكتشفت المئات من إنزيمات البيتالاكتاميز المختلفة ( 7). وهذه الإنزيمات لها أثر كبير ومهمٌ في انتشار المقاومة للمضادات الحيوية، وربما سوف تحدد الاختيارات المستقبلية للمضادات الحيوية المستعملة في علاج الإصابات المهددة للحياة، والمتسببة عن سلالات من بكتيريا*P. aeruginosa* المنتجة لهذه الانزيمات ونظرا لعدم توافر دراسة سابقة عن انواع إنزيمات الـOXA بيتا لاكتاميز في الديوانية كان هدف البحث هو معرفة انتشار البيتالاكتاميز نوع OXA في عزلات *P. aeruginosa* المعزولة من الحالات السريرية وبيئة مستشفيات مدينة الديوانية.

**المواد وطرق العمل Materials and methods:**

**جمع العينات Samples collection:**

**الفحوصات الكيموحيوية Biochemical tests :**

جمعت 390 عينة شملت 292 عينة سريريه من حالات التهابية مختلفة تمثلت بالتهابات المجاري البولية والحروق و الإذن والتهابات القناة التنفسية من المرضى الوافدين والراقدين و 98 عينة بيئية لأدوات طبية وأرضية مستشفى الديوانية التعليمي في محافظة الديوانية للفترة من تشرين الاول 2012 الى اذار 2013 م .

**العز ل والتشخيص Isolation and identification :**

نقلت العينات مباشرة الى مختبر كلية العلوم لغرض تنميتها وتشخيصها اذ زرعت على اطباق بتري حاوية على وسط اغار الماكونكي ثم زرعت بطريقة التخطيط (Streaking method) وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 18-24 ساعة (8). تم دراسة الخصائص المظهرية للإحياء المجهرية المعزولة من خلال زرع العينات مباشرة في الأوساط الزرعية والتي صبغت بواسطة صبغة غرام لدراسة الخصائص المظهرية للأنواع البكتيرية المعزولة. كذلك درست الصفات المظهرية لكل من المستعمرات والخلايا البكتيرية النامية على الأوساط الزرعية المختلفة شملت دراسة المستعمرات البكتيرية من حيث اللون والشكل و القوام والحواف والنمو أو عدم النمو على الأوساط التفريقية (Differential media) حيث زرعت على وسط اغارالماكونكي والانتقائية *Pseudomonas* Agar P ، أما الصفات المظهرية للخلايا فقد شملت شكل الخلية البكتيرية، انتظام الخلايا البكتيرية مع بعضها وطبيعة تفاعلها مع صبغة غرام.

الكشف عن إنزيم الكاتيليز Catalase test: اجري الفحص بالاعتماد على طريقة (9). الكشف عن انزيم الاوكسيدز Oxidase test : اجري الفحص بالاعتماد على طريقة (8).

الكشف عن انتاج الهيمولايسين Haemolysin: production اجري الفحص بالاعتماد على طريقة (8).

الكشف عن كبريتيد الهيدروجين Production of hydrogen sulfite: اجري الفحص بالاعتماد على طريقة (8).

اختبار استهلاك السترات Citrate utllization test: اجري الفحص بالاعتماد على طريقة (9).

اختبار قابلية الحركة Motility test : اجري الفحص بالاعتماد على طريقة (9).

فحص تخمير الكربوهيدرات Carbohydrate fermentation test: اجري الفحص بالاعتماد على طريقة (8).

الكشف عن انتاج ألا ندول Indol test: اجري الفحص بالاعتماد على طريقة (8).

اختبار احمر المثيل Methyl red test: اجري الفحص بالاعتماد على طريقة (9).

اختبار الفوكس بروسكور Voges pros-kauer test : اجري الفحص بالاعتماد على طريقة (9).

الكشف عن انزيم اليوريز Urease test: اجري الفحص بالاعتماد على طريقة (8).

**العُدد الجاهزة Kits:**

عدة لستخلاص الحمض النووي (DNA extraction kit) . South Korea. Geneaid.

العدة المستعملة في تقنية تفاعل البلمرة المفرد (Single South Korea. Geneaid.PCR)

العدة المستعملة في تقنية تفاعل البلمرة المتعدد ( Multiplex PCR). South Korea. Geneaid .

**استخلاص الحامض النووي البكتيري**

تم لستخلاص الحمض النووي (DNA) باستعمال العدة الجاهزة وبحسب تعليمات للشركة المجهزة Geneaid . South Korea

**برنامج الدورات الحرارية لتضخيم ألـ DNA أجري تفاعل** إنزيم البلمرة باستخدام المضخّم الحراري لجهاز الـ (Thermocycler PCR). وتم برمجة الجهاز للجينات قيد الدراسة حسب التفاعل .

**جدول (1)بادئات الـDNA (DNAprimers) المجهزة من شركة Bioneer – كوريا الجنوبية**

| نوع البادئ | تسلسل القواعد للنتروجينية ('3-'5) | | حجم ناتج التضخيم | Homology with genes | المصدر |
|---|---|---|---|---|---|
| 16S Rrna | F | GGTGGTTCAGCAAGTTGGAT | 473 bp | صمم في هذه الدراسة | (10) |
| | R | ATGCAGCACCTGTGTCTGAG | | | |
| OXA-10 | F | TCAACAAATCGCCAGAGAAG | 276 bp | OXA I group (OXA-10) ESBL | |
| | R | TCCCACACCAGAAAAACCAG | | | |
| OXA-2 | F | AAGAAACGCTACTCGCCTGC | 478 bp | OXA II group (OXA-2) ESBL | |
| | R | CCACTCAACCCATCCTACCC | | | |
| OXA-1 | F | TTTTCTGTTGTTTGGGTTTT | 427 bp | OXA III group (OXA-1) ESBL | |
| | R | TTTCTTGGCTTTTATGCTTG | | | |
| OXA-18 | F | CGATTACGGCAACAAGGA | 322 bp | OXA-18 ESBL | |
| | R | TTAGGCGGGCGAAGACGA | | | |
| LCR-1 | F | CCTTTGGTCTCTTTATTGCG | 706 bp | OXA group V | |
| | R | CGTCTTTGGCTATCTGCGTT | | | |

**الترحيل الكهربائي في هلام الاغاروز** تم أجراء الترحيل الكهربائي لهلام الاغاروز المحضر بنسبة 1.5% تحت فرق جهد 100 فولت وتيار 80 امبير وزمن ساعة لغرض الكشف عن حزم (Bands) الـ DNA المستخلص والـ DNA المضخم والذي يمثل نواتج التضخيم (Amplicon size) او نواتج الـ PCR (PCR Products) وبالمقارنة مع سلم الحمض النووي القياسي Ladder 100-1500bp DNA .

**جدول رقم (2)مكونات وحجوم مزيج تفاعل إنزيم البلمرة**

| PCR master mix | | Volume |
|---|---|---|
| DNA template | | µL 5 |
| Primer | Forward primer | 1.5µL |
| | Reverse primer | 1.5µL |
| PCR water | | µL 12 |
| Total | | µL 20 |

**جدول رقم (3) الظروف المستخدمة في جهاز الدورات الحرارية( PCR)**

| المورثات | الظروف المستخدمة في جهاز الدورات الحرارية | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | المسخ الأولي (دورة واحدة) | دورة(35) | | | الاستطالة النهائية (دورة واحدة) |
| | | المسخ | التثبيت | الاستطالة | |
| *bla*OXA-10 *bla*OXA-18 | دقيقة 5 مْ / 96 | ثانية 30 مْ /96 | ثانية 30 مْ/53 | دقيقة 1 مْ /72 | دقائق 5 مْ/ 72 |
| *bla*LCR-1 *bla*OXA-1 | دقيقة 5 مْ / 96 | ثانية 30 مْ /96 | ثانية 30 مْ/ 55 | دقيقة 1 مْ /72 | دقائق 5 مْ/ 72 |
| *bla*OXA-2 | دقيقة 5 مْ / 96 | ثانية 30 مْ /96 | ثانية 30 مْ/ 58 | دقيقة 1 مْ /72 | دقائق 5 مْ/ 72 |
| *bla* 16s-r RNA | دقيقة 5 مْ / 96 | ثانية 30 مْ /96 | ثانية 30 مْ/ 56 | دقيقة 1 مْ /72 | دقائق 5 مْ/ 72 |

**النتائج Result الفحوصات الكيموحيوية Biochemical Tests**

شخصت العزلات بالاعتماد على الفحوصات الكيموحيوية حيث استجابة جميع العزلات لكل من اختبار الكتاليز والاندول وفحص الاوكسيديز , اما بالنسبه لزرعها على الوسط الانتقائي Pseudomonas Agar P فكانت النتيجه موجبه لجميع العزلات حيث تلون الوسط بأكمله بصبغة البايوسينين, , وموجبة لاختبار أحمر المثيل واستهلاك السترات وسالبة لفوكس بروسكاور ، كما اتصفت جميع العزلات بعدم قدرتها على أنتاج غاز $H_2S$ و $CO_2$ ولها القابلية على تخمر الكالكتوز والسكروز . وجاءت هذه الصفات متفقة مع ما ذكره (8).

**الاعداد والنسب المئوية لعزل بكتريا الـ P. aeruginosa**

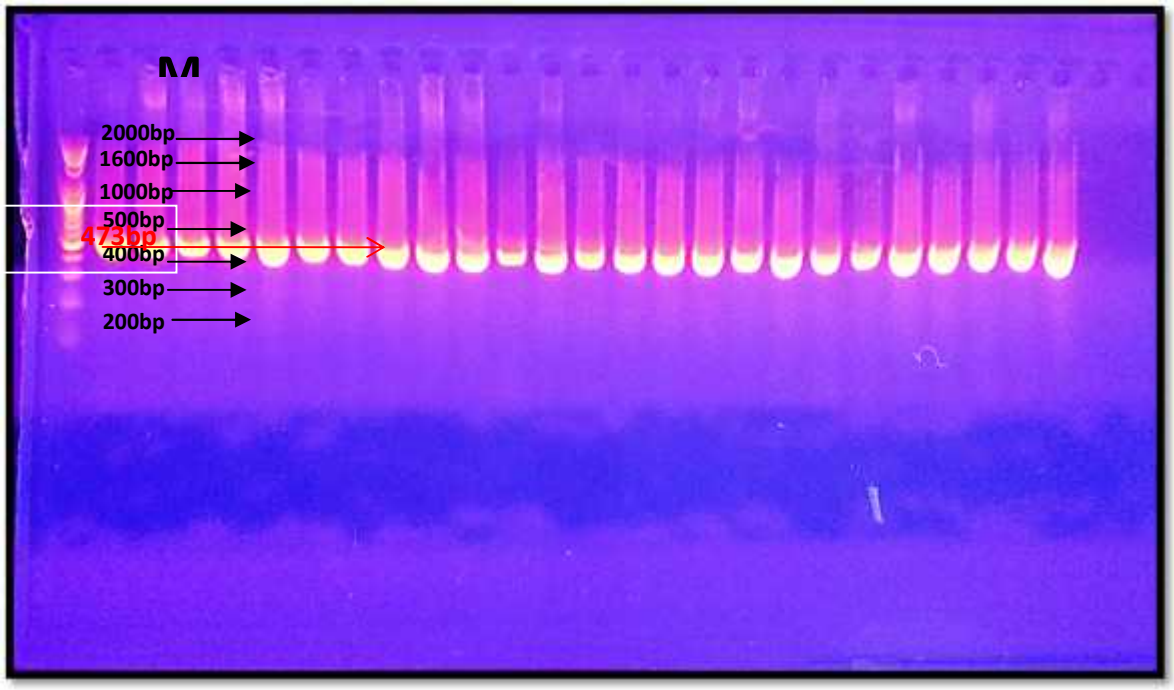
شخصت 50 عزلة بنسبة عزل (12.8% ) من مجموع 390 عينه, بنما كانت بقية الانواع والاجناس البكتيريه السالبة لصبغة غرام 156 عزله وبنسبة (40%) اما ما تبقى فكانت عينات خالية من النمو البكتيري ووزعت العينات بحسب مصادر جمعها الى سريرية بنسب وبيئية بنسبة (11.2%)11 كما مبين في الجدول رقم (4) ادناه(13.3%)39:

**جدول (4) العزل الاولي للعينات السريرية والبيئية**

| مصادر العينات | عدد العينات | عدد العزلات | عدد عزلات البكتريا السالبة لصبغة اغرام | عدد العينات الخالية من النمو البكتيري |
|---|---|---|---|---|
| **السريرية** | **292** | **39 (13.3%)** | **120 (41%)** | **133 (45.5%)** |
| **البيئية** | **98** | **11 (11.2%)** | **36 (36.7%)** | **51 (%52)** |
| **الكلية** | **390** | **50 (12.8%)** | **156 (%40)** | **184 (47%)** |

**الكشف الجزيئي التأكيدي لبكتيريا *P. aeruginosa***

اشارت الدراسة الحالية الى احتواء عُزلات *P. aeruginosa* (50 عُزلة) جميعها على مورثة 16s– ribosomal RNA التي تُمثّل المورثة التشخيصيّة المصممة في هذه الدراسة والبالغ وزنها الجزيئي (473bp) مما يُثبت عائدية العزلات (50 عزلة) جميعها لبكتيريا *P. aeruginosa* كما موضح في الشكل ( 1 )

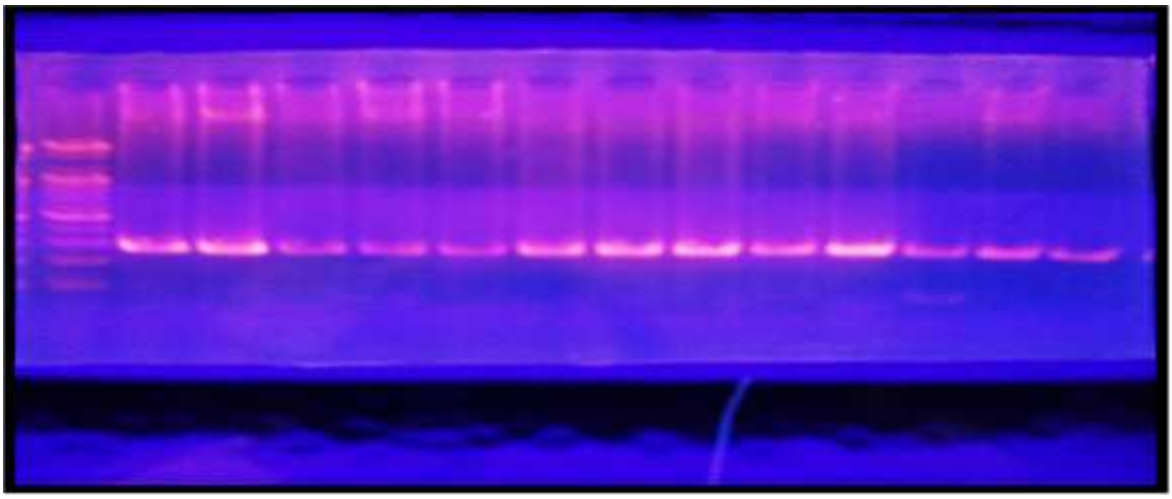


شكل (1): الترحيل الكهربائي لمورث 16s-ribosomal RNA المتضاعفة باستعمال تقنية

ألـ(PCR) لعزلات *P. aeruginosa* من (1-25) عزلة

### انتشار إنزيمات الـOXA بيتا لاكتاميز في عزلات بكتيريا *P. aeruginosa*

تم التحري عن قابلية 50 عزلة *P. aeruginosa* على إنتاج إنزيمات الـOXA بيتالاكتاميز واسعة الطيف (ESBLs) باستعمال تقنية سلسلة تفاعل إنزيم البلمرة PCR، ومن خلال استعمال قطع من DNA ذات عدد محدود من النيوكليوتايدا تعمل بادئات متخصصة (Oligonucleotid) لمورثات الـOXA بيتالاكتاميز,والتي شملت مورثات *bla*$_{LCR-1}$ , *bla*$_{OXA-10}$ , *bla*$_{OXA-2}$, *bla*$_{OXA-1}$, *bla*$_{OXA-18}$ ، كما اعتمدنا على مستخلص DNA لبكتيريا *P. aeruginosa* والذي حصلنا عليه باستعمال العدة المستعملة له يبين الشكل (2) والجدول (3) احتواء عزلات *P. aeruginosa* قيد الدراسة المورث *bla*$_{OXA-10}$ بواقع 50/50(100%) شملت العزلات التي مصدرها عينات بيئية 11/11 و التي مصدرها عينات سريرية 39/39 .



**الشكل (2): الترحيل الكهربائي لمورث blaOXA-10 المتضاعفة باستعمال تقنية ألـ (PCR) لعزلات *P.aeruginosa* من (1-13) عزلة.**

**جدول (5) النسب المئوية لإنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف نوع OXA في بكتريا *P. aeruginosa***

| مصدر العزل | عدد العزلات | *bla*$_{OXA-10}$ | *bla*$_{OXA-2}$ | *bla*$_{OXA-1}$ | *bla*$_{OXA-18}$ | *bla*$_{LCR-1}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| الإدرار | 17 | 17 (%100) | 0 (%0.0) | 0 (%0.0) | 0 (%0.0) | 0 (%0.0) |
| الحروق | 9 | 9 (%100) | 0(%0.0) | 0 (%0.0) | 0 (%0.0) | 0 (%0.0) |
| القشع | 8 | 8(%100) | 0(%0.0) | 0 (%0.0) | 0 (%0.0) | 0(%0.0) |
| الاذن | 5 | 5(%100) | 0(%0.0) | 0(%0.0) | 0 (%0.0) | 0(%0.0) |
| الارضية | 6 | 6(%100) | 0(%0.0) | 0(%0.0) | 0 (%0.0) | 0(%0.0) |
| الادوات الطبية | 5 | 5(%100) | 0(%0.0) | 0 (%0.0) | 0 (%0.0) | 0(%0.0) |
| المجموع | 50 | 50(%100) | 0(%0.0) | 0 (%0.0) | 0 (%0.0) | 0(%0.0) |

**المناقشه Discestion:**

**عزل بكتريا الـ *P. aeruginosa* وتشخيصها :**

أظهرت نتائج الفحص المجهري ان خلايا البكتريا المعزولة عصويه الشكل ، مفرده او ثنائيه الترتيب ، سالبه لصبغة غرام ، مكونه للمحفظه وكانت المستعمرات على وسط أكار الماكونكي شاحبة عديمة اللون لعدم قدرتها على تخمير سكر اللاكتوز الموجود في الوسط الزرعي ولها رائحة شبيهة برائحة العنب المتخمر ، أما على وسط أكار الدم فظهرت مستعمراتها بلون غامق وأغلبها محاطة بهالة شفافة مما يدل على قدرتها على تحلل الدم، وجاءت هذه الصفات مطابقة للصفات التي أوردها (11 ),كما اظهرت المستعمرات على وسط Pseudomonas Agar P ناعمة ,مرتفعه قليلا ,تتراوح اقطارها بين (1-3) ملي متر ذات لون ازرق مخضر او اخضر بسب انتاجها صبغه البايوسين بالاضافه الى تلون الوسط بأكمله بهذه الصبغه ولهذا الوسط خصائص تعزز من انتاج البايوسين اعتمادا على مكونات هذا الوسط، .

اثبتت هذه الدراسه عائديه 50 عزله *P. aeruginosa* بنسبة(12.8% ) وأظهرت النتائج بأن أعلى نسبة عزل لبكتريا *P. aeruginosa* كانت للعينات السريرية إذ بلغت ( 13.3% ,n=39)في حين بلغت نسبة العزل للعينات البيئية (n=11,11.2%)، ويمكن أن يعزى السبب في ارتفاع نسب عزل*P. aeruginosa* العينات السريرية إلى كون الإنسان يمثل وسط إنمائي غني بالمواد التي تحتاجها البكتريا وتوفيره لدرجات الحرارة والرطوبة الملائمتين للنمو والتكاثر وعلى الرغم من وجود الوسائل الدفاعية والمناعية لجسم الإنسان إلا أن P. aeruginosa.تستطيع أن تجد مواطن عديدة للتكاثر والاستعمار الطويل الأمد (12) .

تتفق نتائج دراستنا هذه مع ماتوصلت اليه الدراسات( 13)( 14) ) في مستشفيات مدينة النجف ومقاربه لما حصل عليها(15)في مدينة الديوانيه بأن سلالات بكتريا P. aeruginosa في الوقت الحاضرهي واحدة من أكثر المسببات المرضية المرتبطة بالمستشفيات، وهذا وارد في الدراسات السابقة لكونها من المُمرضات الإنتهازية الثانوية التي تتميز بقدرتها على إحداث أنواع مختلفة من الإصابات وبشكل متزايد في مواقع متعددة من الجسم (16) ، وأسباب هذه الزيادة غير مفهومة بشكل كامل، ولكن بلا شك يكون للاستعمال الواسع وغير المقنن للعلاج السريري بالمضا دات الحيوية أثر كبير في المقاومة التي تبديها البكتريا، اضافة الى إمتلاكها للعديد من عوامل الضراوة كالإنزيمات والذيفانات وقدرتها العالية على الإلتصاق بالأغشية المخاطية للأنسجة الطلائية ومتطلباتها التغذوية القليلة, (17). كما أنها تزداد إصابةً وضراوةً في المرضى الذين يعانون أمراضاً مزمنة والذين يتناولون الأدوية المُثبِطة للمناعة (18) .

**الكشف الجزيئي التأكيدي لبكتيريا P. aeruginosa باستعمال تقنية PCR**

وبالتالي تكون العزلات العائدة للنوع الواحد مشتركة بنسبة 99-100 % بالتسلسل النيوكلوتيدي مع بعضها البعض(19) اشارت الدراسة الحالية الى احتواء عُزلات *P. aeruginosa* (50 عُزلة) جميعها على مورثة 16s-ribosomal RNA التي تُمثّل المورثة التشخيصيّة المصممة في هذه الدراسة لبكتيريا *P. aeruginosa* والبالغ وزنها الجزيئي (473bp) مما يُثبت عائدية العزلات (50 عزلة) جميعها لبكتيريا *P. aeruginosa* كما موضح في الشكل (4-2) اذ ان استخدام هذه التقنية في التشخيص لأول مرة مهمة جدا لتشخيص هذه البكتيريا الخطرة ,وتعد استعمال 16s-ribosomal RNA في تصنيف الانواع البكتيرية يحل مشكلة التغايرات في النمط المظهري للأنواع البكتيرية ويعتمد على تضخيم الجينات بتقنية PCR , و تمتلك

انواع البكتيريا جميعها على منطقة جينية محدد وفريدة تسمح بتحديد ذلك النوع البكتيري

**انتشار إنزيمات الـOXA بيتا لاكتاميز في عزلات بكتيريا *P. aeruginosa***

نظراً لعدم توافر معلومات عن مدى تواجد وتكرار إنزيمات الـOXA بيتا لاكتاميز في العزلات السريرية والبيئية لبكتيريا *P. aeruginosa* التي تستوطن المستشفيات في العراق بصورة عامة ومدينة الديوانية بصورة خاصة، ارتأت الدراسة الحالية التحري عن قابلية 50 عزلة *P. aeruginosa* على إنتاج إنزيمات الـOXA بيتالاكتاميز واسعة الطيف (ESBLs) باستعمال تقنية سلسلة تفاعل إنزيم البلمرة PCR، ومن خلال استعمال قطع من DNA ذات عدد محدود من النيوكليوتايدا تعمل بادئات متخصصة (Oligonucleotid)لمورثات الـOXA بيتالاكتاميز,والتي شملت مورثات , *bla*OXA−10 *bla*LCR−1 *bla*OXA−1, *bla*OXA−18, *bla*OXA−2، كما اعتمدنا على مستخلص DNA لبكتيريا *P. aeruginosa* والذي حصلنا عليه باستعمال العدة المستعملة.

يبين الشكل (2) والجدول (4)احتواء عزلات *P. aeruginosa* قيد الدراسة المورث *bla*OXA−10 بواقع 50/50(100%) شملت العزلات التي مصدرها عينات بيئية 11/11بنسبة (100%) و التي مصدرها عينات سريرية 39/39 بنسبة (100 %)، ومن ملاحظة النتائج أعلاه، نجد أنّ نسبة تكرار المورث *bla*OXA−10 هي الأعلى بين عزلات *P. aeruginosa* قيد الدراسة,وقد تم تحديد المورث *bla*OXA−10 في العزلات البكتيرية لأول مرة في مدينة الديوانية وينتمي انزيم OXA−10 بيتالاكتاميزالى OXA group I وتمتلك هذه الانزيمات قدراً كبيراً من التغايرات في تسلسل الحوامض الأمينية (20 ) .ولذلك نجد العديد من الانزيمات المشتقة من انزيم OXA−10 بيتالاكتاميز وهي: OXA −11، OXA −14 ، OXA −16، OXA −17، OXA −74 وتعّد هذه الانزيمات متطورة من انزيم OXA−10 بيتالاكتاميز لكي تحمل صفة المقاومة للعديد من المضادات الحياتية (10) وهذا ما يفسر انتشار المقاومة للمضادات الحياتية أذ يمنح انزيم OXA−10 بيتالاكتاميز مقاومة ضد السيفوتاكسيم, السيفترياكسون اضافة للسيفتازيديم الذي بينت الدراسات السابقة أن المقدار الاكبر من انزيمات OXA البيتالاكتاميز تمنح مقاومة له باستثناء – OXA 17 المشتق من OXA−10 فتكون مقاومته ضعيفة للمضاد نفسه (21) .

نشرت دراسة في العراق من قبل (14) بأن (4 )عزلات من بكتيريا *P. aeruginosa* من مجموع (17)عزلة من العصيات السالبة لصبغة غرام الاخرى جميعها حاملة للمورث *bla*OXA المنتج لانزيم OXA ولاحظ بان هذه العزلات الحاملة للمورث المذكور كانت جميعها ذات مقاومة متعددة للأدوية ولعدم توافر دراسة سابقة لانزيمات OXA بيتالاكتاميز ومجاميعها في المنطقة للمقارنة ،قورنت النتائج التي حصلنا عليها مع دراسات ذات صلة أُجريت في دول العالم ومنها دراسة في كوريا من قبل (22)أذ بلغت نسبة تردد المورث *bla*OXA−10 بين عزلات *P. aeruginosa* (13.1%) ، في ما يرى (23 )في دراسته أنّ هذا المورّث يتردد بشكل كبير بين عزلات *P. aeruginosa* في مستشفيات ايران إذ كانت نسبة تواجده (92.7%) ، أما (24)فتوصلت في دراستها الى أن نسبة تكرار إنزيم OXA−10 بين 14 عزلة سريرية لبكتيريا *P.aeruginosa* ذات مقاومة متعددة (MDR ) (57%)

كانت نتائج الدراسة الحالية التي كشفت عن تواجد إنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف نوع OXA−10في

عزلات لبكتيريا *P. aeruginosa* بنسبة (100%) والتي حصلنا عليها من مستشفى الديوانية التعليمي هي الأولى من نوعها ، و إنّ إنتشار هذه الإنزيمات يصبح سهلاً بوساطة البلازميدات والعناصر المتنقلة الأخرى ، و لهذه المعلومات أهمية في المختبرات السريرية التي ربما تفتقر إلى التعرف على هذا الإنزيم مما يعرض العلاج الكيموحيوي بالمضادات الحيوية للفشل، وإنّ هذا يؤكد أنّ *P. aeruginosa* ربما تصبح مصدراً كامناً لمورّثات OXA-10.

**المصادر References**:


1- Greenwood, D.; Finch, R.; Davey, P. and Wilcox, M. (2007). Antimicrobial chemotherapy. Oxford University Press, New York.

2- DeMiguel Martinez, I.;Del Rosario Quintana, C.; Bolanos, Rivero, M. and Ramos Macias, A. (2005). Aetiology and therapeutic considerations in chronic otitis media. Analysis of a 5 years period. Acta. Otorrinolaringol. Esp. 56 (10): 459 – 462.

3- ZENG L, (2004), *Pseudomonas aeruginosa* Pathogenicity And Antibiotic Resistance Doctor Of Philosophy University Of Florida,.

4- Todar, K. (2004) .Text Book of Bacteriology Written and Edited by Kneth Todar university Todar online text book of Bacteriology .

5- Ryan, K. J.; and Ray, C. G. (2004). sherris medical microbiology 4th ed. McGraw-Hill-NewYork. S5-9

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

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

8- MacFaddin, J.F.(2000). Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins, USA.

9- Collee, J.G., Marmion, B.P, Fraser, A.G. and Simmons, A.(1996). Mackie & McCarthy–Practical Medical Microbiology. 4th ed., Longman Singapore Publishers (Pte) Lt. Singapore pp 361 – 381

10- Bert F, Branger C, Zechovsky NL. (2002). Identification of PSE and OXA b-lactamase genes in Pseudomonas aeruginosa using PCR-restriction fragment length polymorphism. J Antimicrob Chemother; 50:11–8..

11- Jawetz, E., Melnik, J.L. ; Adelberg , E.A.; Brook, G.F.; Butel, J.S. and Morse , S.A. (2010). Medical Microbiology 26th. ed. Appleten and Lang New York. Connctical. PP.45-60 .

12- Thomson, N. *et al.*, (2004). The role of prophage-like elements in the diversity of *Salmonella enterica* serovars. J. Mol. Biol.,339 (2): 279-300.

13- Al-Shara,J.M(2013). Phenotypic and Molecular Detecting of Carbapenem Resistant*Pseudomonas aeruginosa* in Najaf Hospitals. M.Sc. Thesis. Collegeof Medicine. University of Kufa.

14- Al-Muhannak,F.H.,(2010). Spread of Some Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Clinical Isolates of Gram-Negative Bacilli in Najaf. M.Sc. Thesis. Collegeof Medicine. University of Kufa.

15- Harran, Omar Hussein (2012). Investigation of resistance genes for anti-B-lactam

antibiotics of bacteria isolated from some clinical cases in the province of Diwaniyah. Master Thesis, Faculty of Science, University of Qadisiyah.

16- Willenbrock, H.; Friis, C.; Friis, A.S. and Ussery, D.W. (2006). An environmental Signature for 323 microbial genomes based on codon adaption indices genome. Biol., 7 : R114 .

17- Suzuki, T.; Moraes, T. J.; Vachon, E.; Ginsberg, H.; Huang, T.; Matthay, M. D.; Marshall, J.; McCulloch, C. A.; Abreu, T. S.; Chow, C. and Downey, G. P. (2005). Protienase – activated reseptor – 1 mediates elastase – induced apoptosis of human lung epithelial cells. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 33: 231–247.

18- Willenbrock, H. and Ussery, D.W. (2007). Prediction of highly expressed genes in microbes based on chromatian accessibility . BMC, Mol., Biol., 8: 11 .

19- Damien Ferguson(2007). A study of clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* and the investigation ofantibiotic resistance mechanisms in themultidrug resistant strain PA13, Dublin City University,Dublin 9,Ireland.

20- Pai, H.; Wonkim, J.; Kim, J.; lee, J.; CHOE, K. W. and Gotoh, N. (2001a). Carbapenem Resistance Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 45: 480 – 484.

21- *Danel, F., Hall, L. M. C., Duke, B., Gur, D. & Livermore, D. M. (1999). OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 β-lactamase, isolated from Pseudomonas aeruginosa. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 43, 1362–1366*

22- *Seungok Lee1, Yeon-Joon Park2*, Myungshin Kim2, Hae Kyung Lee2, Kyungja Han2, Chang Suk Kang2 and Moon Won Kang3. (2005). Prevalence of Ambler class A and D b-lactamases among clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa in Korea. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 56, 122–127*

23- Fereshteh Shacheraghi, Mohammad Reza Shakibaie, Hanieh Noveiri. ( 2010) . Molecular Identification of ESBL Genes blaGES-1, blaVEB-1, blaCTX-M blaOXA-1, blaOXA-4, blaOXA-10 and blaPER-1 in Pseudomonas aeruginosa Strains Isolated from Burn Patients by PCR, RFLP and Sequencing Techniques. International Journal of Biological and Life Sciences 6:3.

24- Fatma BUDAK1, Murat KASAP2, Fetiye KOLAYLI1, Aynur KARADENİZLİ1, Mustafa Haluk VAHABOĞLU3. (2012). Integron-associated resistance genes among multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa isolated from clinical specimens; 42 (1): 149-156 .

# Prevalence of OXA beta -lactamaes of *pseudomonas aeruginosa* in Al-Diwaniya City .

**Receved : 31/10/2016** **Accepted :28/1/2017**

**Rana Masheel Salim** **Syoof Khowman Alwan**

Biology Department , Collage of Science , Al-Qadisiyah University

**Gmail : ranaalzydee.com**

**Abstract :**

In this study, 390 samples were collected from different sources from Al-Diwaniya teaching Hospital during the period of November 2011 until March 2012,and they includ ( 292 clinical specimens and 98 environmental sample) , the results of cultural and biochemical tests showed that 50 isolates (39 of them were from clinical cases and 11 were from environmental samples),belonged to *p. aeruginosa* , and their diagnosis were confirmed by 16s-ribosomal RNA ,and the study showed that all the isolates containing the 16s-ribosomal RNA gene , which represents the designed diagnostic gene in this study .

The ability of these isolates to produce broad-spectrum OXA β- lactames enzymes groups was investigated thrrough detection of presence of genes blaOXA-10, blaLCR-1, blaOXA-18, blaOXA-1, blaOXA-2 in these isolates by using the polymerization chain reaction enzyme technology] (PCR) it showed 50/50 (100%) isolates contain blaOXA-10 gene, which belongs to the OXA group I, and the results of this study showed no amplification results for blaOXA-18, blaLCR-1, blaOXA-1, blaOXA-2 genes ,which belong to the main groups of broad-spectrum OXA β- lactames enzymes which are OXAgroup II ,OXAgroup III and OXA groupV respectively except OXA18 enzyme which is not belonging to any of these groups .

Key word : *Pseudomonas aeruginosa* , enzymes

Microbiology Classification QR 75- 99.5

* The research is a part of M.sc. thesis in the case of first researcher.