علاقة لكتينات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* مع بعض عوامل الضراوة الأخرى

احمد نوري حامد الكبيسي*، صفاء عبد لطيف المعيني** ومحمد إبراهيم نادر***

*قسم تربية هيت/ وزارة التربية

**كلية العلوم/ جامعة الأنبار

***معهد الهندسة الوراثية/ جامعة بغداد

الخلاصة

جمعت 152 عينة سريرية من بعض مستشفيات بغداد، أما عزلات التليف الكيسي فقد حصل عليها من طلبة الدراسات العليا في معهد الهندسة الوراثية وعددها 6، عزلتُ وشخصت 62 عزلة من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*. كشف عن وجود جين *16S rRNA* الذي يعد جيناً تشخيصياً وباستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل وأظهرت نتائج الترحيل الكهربائي وجود الجين في جميع العزلات المدروسة والذي يبلغ حجمه 956 زوج قاعدي. اختيرت 44 عزلة لإجراء اختبار الحساسية تجاه 11 نوع من المضادات الحيوية وأظهرت العزلات مقاومة عالية لمضادات Ampicillin، Amoxicillin وNalidixic acid ثم تدرجت مقاومة البكتريا لمضادات Cefotaxime، Ceftazidimim، Tetracycline، Amikacin، Augmantin، Vancomycin وChloramphenicol في حين كانت نسبة المقاومة منخفضة لمضاد Imipenem. أختيرت 17 عزلة لإختبار قابليتها على إنتاج اللكتينات عن طريق التلازن مع كريات الدم الحمر للإنسان بفصائلها (A,B,O) ، واختبار قابليتها على إنتاج البروتييز والهيمولايسين والبايوسيانين وأظهرت مستخلصات اللكتينات لعزلات بكتريا *P. aeruginosa* تبايناً في الفعالية التلازنية تجاه كريات الدم الحمر للإنسان وبعيارية تراوحت بين صفر و128، كما أظهرت النتائج وجود قابلية متباينة لعزلات بكتريا *P. aeruginosa* في فعالية إنزيم البروتيز تراوحت بين صفر وحدة/ مليلتر و340 وحدة/ مليلتر، أبدت هذه العزلات أيضاً تبايناً في فعالية إنزيم الهيمولايسين بعيارية فاعلية تراوحت بين صفر و32، وأظهرت نتائج اختبار العزلات قيد الدراسة في قابليتها على إنتاج صبغة البايوسيانين تبايناً من حيث الشدة والكمية وبامتصاصية تراوحت بين صفر و0.93 عند طول موجي 400 نانومتر، ولوحظ وجود علاقة طردية بين الفعالية التلازنية للكتينات وفعالية أنزيمات البروتيز والهيمولايسين وصبغة البايوسيانين وإنتاج الغشاء الحيوي إذ ان العزلات ذات الفعالية التلازنية العالية تكون فعالة في إنتاج البروتيز والهيمولايسين والبايوسيانين وبالعكس.

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

e-mail: hanata_1987@yahoo.com

Relationship of Lectins *Pseudomonas aeruginosa* bacteria with some other virulence factors

A. N. Hamid*, S. A. L. Al Maeny and M. I. Nader*****

***Department of Heet Education, Ministry of Education**

****College of Science/ University of Anbar**

*****Institute of Genetic Engineering/ University of Baghdad**

Abstract

One hundred fifty-two 152 clinical samples were collected from some Baghdad hospitals. About cystic fibrosis samples, 6 samples were obtained from post graduate students in Institute of Genetic Engineering. From different sources, 62 isolates of *Pseudomonas aeruginosa* had been identified. 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 isolates. Fifty-four 44 isolates, were selected to

investigate the Susceptibility Test toward 11 types of antibiotics and 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. Also, 17 isolates were selected for testing their capability to produce Lectins by the agglutination with human RBCs in their groups (A, B, and O), and testing their capability for production of protease, hemolysin, and pyocyanin. Indeed, Lectins extracts of *P. aeruginosa* strain showed variance agglutination activity toward human RBCs at standard ranged from zero to 128. The results revealed finding variance capabilities in activity of protease of the bacteria isolate *P. aeruginosa* ranging from 0-340 unit/ml. Those isolates exhibited a variance in the hemolysin activity at standard ranged from 0 to 32. Results of ability for pyocyanin producing showed variance in the strength and the quantity at absorbance ranged from 0 to 0.93 at 400 nm. An extrusive Correlation is noticed among agglutinatinal activity for Lectins and protease, hemolysin, and pyocyanin pigment activities. So, the isolates which have high agglutionational activity are bioactive in protease, hemolysin and pyocyanin, and on the contrary.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, PCR, *16S rRNA*, Sensitivity test, Lectins.

المقدمة

تعد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من الأجناس البكتيرية واسعة الانتشار في الطبيعة وذات امراضية عالية للإنسان والحيوان والنبات، فهي أحد أهم الأنواع البكتيرية المسببة لما يعرف بالإصابات المكتسبة في المستشفيات (1)، وتسبب أمراضاً عديدة في جسم الإنسان، منها اخماج الجروح والحروق والعين والجلد والمجاري البولية والأذن الوسطى وتجرثم الدم واخماج العظام والمفاصل (2). يعزى سبب قدرة هذه البكتريا على إحداث الإصابات 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 (3). تمتلك بكتريا *P. aeruginosa* القدرة على مقاومة مدى واسع ومتنوع من المضادات الحيوية، الشيء الذي جعلها من بين أهم وأخطر مسببات الأمراض للإنسان(4). تنتج البكتريا نوعين من اللكتينات هما لكتين A ولكتين B، وترتبط هذه الكتينات بالكربوهيدرات إذ يرتبط لكتين A تحديداً بسكر الكلاكتوز بينما يرتبط لكتين B بسكر الفركتوز وتلعب هذه اللكتينات دوراً مهماً في التصاق البكتريا على سطوح الخلايا المضيفة (5). تكمن أهمية اللكتينات في كونها عامل ضراوة يرتبط مع عوامل الضراوة الأخرى وتنتج البكتريا هذه اللكتينات عندما تصل إلى الطور الثابت من مراحل نموها والتي يشفر لها جينات موجودة في مادتها الوراثية وينظم التعبير عنها بالمشاركة مع بعض عوامل الضراوة الأخرى 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 أنواع مختلفة من السكريات (7). تتواجد اللكتينات على سطوح خلايا البكتريا أو في مستخلص الخلايا الحاوية عليها، وازداد اهتمام الباحثين باللكتينات لما لها من دور كبير إذ تعمل كجزيئات تعريف عند التفاعل بين البكتريا والخلايا الطلائية والخلايا البلعمية، ونتيجة لتخصصها على الارتباط بالسكريات تعد من الأدوات المهمة في تمييز المستقبلات السطحية للخلية (8).

المواد وطرق العمل

- **جمع العينات:** جمعت 152 عينة من مرضى يعانون من مختلف الحالات المرضية شملت أخماج الحروق، الجروح والتهاب الإذن الوسطى. إذ تم الحصول على العينات من مختبرات بعض المستشفيات في بغداد شملت

مستشفى اليرموك التعليمي ومستشفى الكندي والمختبرات التعليمية ومستشفى الشيخ زايد، أما عينات التليف الكيسي فقد حصل عليها من طلبة الدراسات العليا في معهد الهندسة الوراثية والبالغة 6 عينات.

- **تشخيص العزلات:** شخصت العزلات اعتماداً على (9) باستعمال الطرق الزرعية باستخدام عدة أوساط زرعية منها وسط أكار الماكونكي ووسط أكار الدم ووسط أكار السترمايد واستعملت الفحوصات البايوكيميائية مثل الاوكسيديز والكاتليز واختبار الاندول واحمر المثيل وفوكاس بروسكاور واستهلاك السترات.
- **استخلاص الدنا الكروموسومي:** استخلصت عينات الدنا الكروموسومي للعزلات البكتيرية باستخدام عدة استخلاص الدنا للبكتريا المنتج من شركة Promega.
- **التحري عن جين *16S rRNA*** : بالاعتماد على وجود الجين *16S rRNA* وباستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل باستخدام البادئ في الجدول (1).

جدول (1) البادئ المستخدم في تفاعل البلمرة المتسلسل

رقم الدخول وموقع الجين	حجم الجين	حجم ألجين المستهدف زوج قاعدي	Tm* درجة مئوية	تسلسل قواعد البادئ 5→3	اسم البادئ
AY268175.1	1466	956	69	GGGGGATCTTCGGACCTCA	*16S rRNA*-F
			70	TCCTTAGAGTGCCCACCCG	*16S rRNA*-R

* (Melting tempreture): درجة انصهار البادئ، ** (Forward): البادئ الأمامي، *** (Reverse): البادئ الخلفي

واستخدم البرنامج الخاص بتفاعل البلمرة المتسلسل للجين كما في الجدول (2)

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

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، فحص الهلام بعد انتهاء الترحيل من خلال تعريضه لمصدر الأشعة فوق البنفسجية وتم تصويره بكاميرا رقمية.

- **اختبار حساسية عزلات بكتريا *P. aeruginosa* للمضادات الحيوية:** اعتمدت طريقة Kirby Bauer لإجراء فحص الحساسية للمضادات الحيوية وباستعمال وسط أكار مولر هنتون واختبرت مقاومة المضادات الحيوية Ampicillin، Amoxicillin , Nalidixic acid , Cefotaxime ، Ceftazidimim ، Tetracycline ، Amikacin، Augmantin ، Vancomycin , Chloramphenicol وImipenem، وتمت مقارنة النتائج بأقطار التثبيط القياسية الواردة في (10).
- **اختبار قابلية بكتريا *P. aeruginosa* على إنتاج اللكتين:** استخدمت الطريقة الموصوفة من قبل (13) والتي تتضمن تخافيف مضاعفة لمستخلصات اللكتين الخام للعزلات البكتيرية المراد اختبارها كل على حدة باستخدام محلول (دارئ فوسفات الصوديوم المضاف له البومين مصل البقر) وأضيف 50 مايكروليتر من عالق كريات الدم الحمر للإنسان (A, B, O) وكل على حدة. حضنت بدرجة حرارة 25 درجة مئوية لمدة ساعة ثم سجلت النتائج على شكل عيارية وهي مقلوب اعلى تخفيف يعطي نتيجة موجبة (تلازن).

- **اختبار قابلية عزلات بكتريا *P. aeruginosa* على إنتاج إنزيم البروتيز:** استخدمت الطريقة الموصوفة من قبل (14).
- **اختبار قابلية عزلات بكتريا *P. aeruginosa* لإنتاج الهيمولايسين:** اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل (15).
- **اختبار قابلية عزلات بكتريا *P. aeruginosa* لإنتاج صبغة البايوسيانين:** استخدمت الطريقة الموصوفة من قبل (15).

النتائج والمناقشة

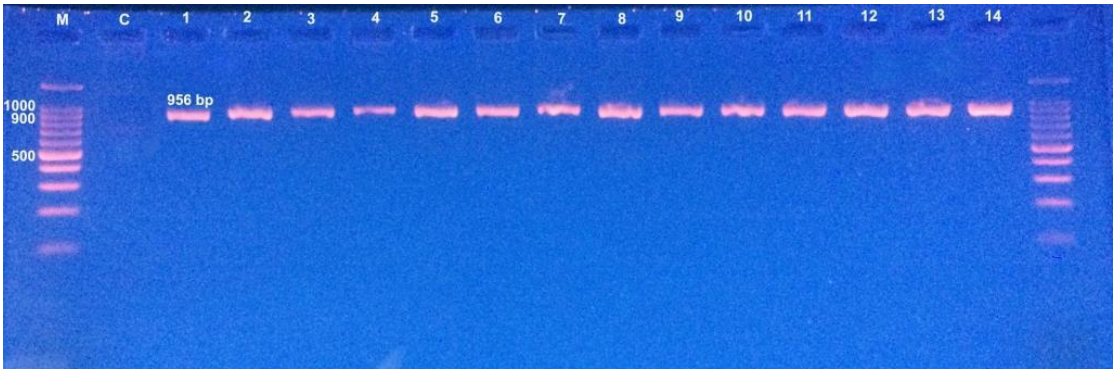
أظهرت نتائج العزل والتشخيص الحصول على 62 عزلة تعود لبكتريا *P. aeruginosa* توزعت بواقع 25 عزلة من الحروق، 14 عزلة من التهاب الإذن و17 عزلة من الجروح و6 عزلات من التليف الكيسي كما في جدول (3).

جدول (3) أعداد 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
المجموع		158	62	

أظهرت النتائج 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 إلى ان هذه البكتريا من الممرضات الانتهازية التي تنتهز فرصة حدوث خلل عام أو موضعي في أحدى دفاعات الجسم الميكانيكية أو المناعية أو كليهما معاً لإحداث الإصابة (16).

- **الكشف عن جين *16S rRNA* لبكتريا *P. aeruginosa*:** أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي لنواتج التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا باستخدام البادئ للجين 16S rRNA، والذي يعد جيناً تشخيصاً لبكتريا *P. aeruginosa* حزم ذات حجم جزيئي 956 زوجاً قاعدياً للعزلات البكتيرية جميعها الشكل (1). وهذا يدعم نتائج التشخيص بالطرق الاعتيادية المظهرية والبايوكيميائية من أن هذه العزلات تعود إلى بكتريا *P. aeruginosa*. تتفق هذه النتائج مع (38) اللذان وجدا ان جميع العزلات المدروسة تحتوي الجين 16S rRNA .



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

- **اختبار حساسية عزلات بكتريا *P. aeruginosa* للمضادات الحيوية:** أظهرت نتائج اختبار الحساسية أن هناك مقاومة عالية جداً أبدتها عزلات بكتريا *P. aeruginosa* لمضادات Ampicillin و Amoxicillin وبنسبة 94% و90.7% على التوالي وهذا يتفق مع النتائج التي حصل عليها (17) إذ كانت نسبة المقاومة لهذين المضادين 100%. فسر هذه النتائج (18) ان مقاومة البكتريا العالية لمضادات البيتالاكتام تعود إلى إمتلاكها إنزيمات البيتا لاكتاميز التي تعمل على تحطيم حلقة البيتالاكتام لهذه المضادات مما يؤدي إلى تحوير

تركيب المضاد وإبطال تأثيره. أظهرت النتائج ان نسبة مقاومة هذه العزلات لمضاد Nalidixic acid كانت 92.5%، وتتفق هذه النتيجة مع (19) إذ حصلت عزلاتها على نسبة مقاومة لمضاد Nalidixic acid بلغت 100%. بينت النتائج ان نسبة مقاومة العزلات لمضادات السيفالوسبورينات المتمثلة Ceftazidimim كانت 70.3% أما مضاد Cefotaxime فقد كانت نسبة المقاومة 83.3%، اتفقت هذه النتائج مع دراسة (20) التي وجدت أن نسب المقاومة لمضاد Ceftazidimim 71%، كذلك اتفقت نتائجنا مع (21) 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 (22) حيث حصل على نسبة 17.33%. بينت النتائج ان نسبة مقاومة العزلات لمضاد Amikacin كانت 72.2**%**، اتفقت النتائج مع (23) الذي ذكر ان نسبة المقاومة لمضاد Amikacinكانت 75%. أظهرت النتائج ان نسبة مقاومة العزلات لمضاد Tetracycline كانت 81.4**%** وهذا يتفق مع (24) حيث أشار إلى ان نسبة مقاومة البكتريا *P. aeruginosa* المعزولة من النماذج المرضية المختلفة لهذا المضاد قد بلغت 87.5%، فسر (25) هذه النتائج على أنها 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 (26) الذي حصل على نسبة مقاومة لهذا المضاد 100%، فسر (27) ان سبب مقاومة بكتريا *P. aeruginosa* لهذا المضاد يعود إلى اشتراك مضخات الدفق مع النفاذية المنخفضة لغشائها في إنتاج المقاومة لمضاد Chloramphenicol. بينت النتائج ان نسبة المقاومة لمضاد Augmantin بلغت 51.8%، اتفقت النتائج مع (28) الذي وجد ان نسبة المقاومة لهذا المضاد كانت 47.5%، أما بالنسبة لمضاد Vancomycin فقد كانت نسبة المقاومة له 38.8% وهذا لا يتفق مع (29) الذي وجد ان نسبة المقاومة لهذا المضاد 74.41%.

- **اختبار فعالية التلازن الدموي للكتينات بكتريا *P. aeruginosa*:** أخضعت العزلات لاختبار التلازن الدموي حيث اختيرت 17 عزلة لهذا الاختبار وأظهرت معظم مستخلصات خلايا بكتريا *P. aeruginosa* فعالية تلازنية تجاه كريات الدم الحمر، إذ يبين الجدول (4) ان هذه المستخلصات قادرة على إحداث التلازن الدموي لكريات الدم الحمر للإنسان بمجاميعه الثلاث (A، B، O) وهذا يعني ان اللكتينات المنتجة من هذه البكتريا غير متخصصة تجاه نوع معين من فصائل دم الإنسان. ويبين الجدول (4) أيضاً ان مستخلصات بعض العزلات تبدي تفاعلا تلازنياً عالياً وأخرى أبدت فاعلية متوسطة في حين لم تظهر بعض العزلات أي فاعلية تلازنية مع كل أو قسم من فصائل الدم. أظهرت النتائج المشار إليها في الجدول أعلاه ان اقوى فعالية تلازنية للكتينات مع كريات الدم الحمر ظهرت في مستخلص العزلة P10، في حين ان مستخلصي العزلتين P4 وP17 لم يبديا أي فعالية تلازنية، وتدرجت مستخلصات العزلات الأخرى في الفعالية التلازنية للكتيناتها مع كريات الدم الحمر بين هاتين القيمتين. تتفق هذه النتائج مع (30) والذي حصل على قيم فعالية تلازنية لمستخلصات عزلاته مشابهة.

جدول (4) قابلية عزلات بكتريا *P. aeruginosa* على التلازن الدموي

رقم العزلة	مصدر العزلة	عيارية التلازن الدموي للكتينات مع كريات الدم			رقم العزلة	مصدر العزلة	عيارية التلازن الدموي للكتينات مع كريات الدم		
		A	B	O			A	B	O
P1	حروق	0	64	64	P10	جروح	128	64	64
P2	حروق	32	0	4	P11	جروح	64	0	32
P3	حروق	64	32	64	P12	جروح	16	8	0
P4	حروق	0	0	0	P13	جروح	0	0	32
P5	حروق	0	0	64	P14	تليف كيسي	32	0	0
P6	إذن	16	4	4	P15	تليف كيسي	16	64	32
P7	إذن	8	0	4	P16	تليف كيسي	4	16	8
P8	إذن	0	64	32	P17	تليف كيسي	0	0	0
P9	جروح	8	16	0					

- **اختبار قابلية عزلات بكتريا *P. aeruginosa* على إنتاج إنزيم البروتيز:** أخضعت نفس العزلات التي تم اختيارها لاختبار التلازن الدموي للكشف عن اللكتينات إلى اختبار قابليتها على إنتاج إنزيم البروتيز. أظهرت النتائج وجود قابلية متباينة لعزلات بكتريا *P. aeruginosa* في إنتاج إنزيم البروتيز، إذ يبين الجدول (5) ان العزلة P10 كانت اكثر العزلات فعالية في إنتاج إنزيم البروتييز إذ بلغت (340 وحدة/ مليلتر)، بينما لم تظهر العزلة P7 أي فعالية لإنتاجه إذ بلغت (صفر وحدة/ مللتر)، وانحصرت قيم الفعالية لباقي العزلات بين هاتين القيمتين. تتفق هذه النتائج مع الباحث (31) التي وجدت مستويات مرتفعة معنوياً من فعالية إنزيم البروتيز المنتج من قبل بعض عزلات الزوائف الزنجارية في حين وجدت مستويات منخفضة معنوياً من الفعالية لإنزيم البروتيز لعزلات أخرى، وذكرت ان هذا يعود إلى اختلاف مصادر العزلات.

جدول (5) قابلية عزلات بكتريا *P. aeruginosa* على إنتاج إنزيم البروتيز (وحدة/ مليلتر)

رقم العزلة	مصدر العزلة	فعاليةالبروتيز وحدة / مليلتر	رقم العزلة	مصدر العزلة	فعاليةالبروتيز وحدة / مليلتر
P1	حروق	75	P10	جروح	340
P2	حروق	53.5	P11	جروح	215
P3	حروق	305	P12	جروح	5
P4	حروق	55	P13	جروح	97.5
P5	حروق	117.5	P14	تليف كيسي	17.5
P6	اذن	23	P15	تليف كيسي	152.5
P7	اذن	0	P16	تليف كيسي	65.5
P8	اذن	115	P17	تليف كيسي	52.5
P9	جروح	22.5			

- **اختبار قابلية عزلات بكتريا *P. aeruginosa* على إنتاج الهيمولايسين:** أظهرت نتائج اختبار العزلات قيد الدراسة في قابليتها على انتاج الهيمولايسين تبايناً كبيراً، ويبين الجدول (6) ان بعض العزلات أظهرت فعالية عالية على إنتاج الهيمولايسن تم تقديرها على شكل عيارية وهي P8, P10, P11 وP15 إذ بلغت عيارية الفعالية لإنزيم الهيمولايسين 32 لكل منها، في حين لم تظهر بعض العزلات فعالية تحليلية لراشح مزارعها

وهي P14, P12, P9, P6 و P17 حيث بلغت عيارية الفعالية لإنزيم الهيمولايسين صفراً لكل منها، أما العزلات الأخرى تدرجت في شدتها لإنتاج الهيمولايسين بين هاتين العياريتين. اتفقت هذه النتائج مع (32) الذي أشار إلى ان البكتريا تختلف في قابليتها على إنتاج الهيمولايسين وان هذا الاختلاف يعود إلى العوامل المؤثرة في إنتاجه منها درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني وعدد البكتريا ومدة الحضن. فسر (33) عدم إنتاجية بعض العزلات لإنزيم الهيمولايسين يرجع إلى امتلاكها أنظمة أخرى خاصة لسحب الحديد وهضمه وتمثيله من الأنسجة، ولذلك يكون إنتاج الهيمولايسين بكميات قليلة لا يمكن ملاحظة تأثيرها.

جدول (6) قابلية عزلات بكتريا *P. aeruginosa* على إنتاج الهيمولايسين

رقم العزلة	مصدر العزلة	عيارية فاعلية إنزيم الهيمولايسين	رقم العزلة	مصدر العزلة	عيارية فاعلية إنزيم الهيمولايسين
P1	حروق	16	P10	جروح	32
P2	حروق	4	P11	جروح	32
P3	حروق	16	P12	جروح	0
P4	حروق	2	P13	جروح	16
P5	حروق	16	P14	تليف كيسي	0
P6	اذن	0	P15	تليف كيسي	32
P7	اذن	4	P16	تليف كيسي	4
P8	اذن	32	P17	تليف كيسي	0
P9	جروح	0			

- **اختبار قابلية عزلات بكتريا *P. aeruginosa* على إنتاج صبغة البايوسيانين:** أظهرت نتائج اختبار العزلات قيد الدراسة في قابليتها على إنتاج صبغة البايوسيانين تبايناً كبيراً من حيث الشدة والكمية، ويبين الجدول (7) ان بعض العزلات أظهرت إنتاجية عالية لهذه الصبغة وهي العزلة P10 بلغت 0.93، في حين ان بعض العزلات لم تظهر إنتاجية لها وهي العزلات P6، P9 و P12 حيث بلغت الامتصاصية على طول موجي 400 نانوميتر صفر، وتذبذبت قيم الامتصاصية للعزلات الأخرى بين هاتين القيمتين. تتفق هذه النتائج مع (34) الذي أشار إلى ان اغلب العزلات لها القابلية على إنتاج صبغة البايوسيانين ولكن بعض العزلات تكون غير قابلة على إنتاج هذه الصبغة.

جدول (7) قابلية عزلات بكتريا *P. aeruginosa* على إنتاج صبغة البايوسيانين

رقم العزلة	مصدر العزلة	درجة الامتصاصية للبايوسيانين عند طول موجي 400 نانوميتر	رقم العزلة	مصدر العزلة	درجة الامتصاصية للبايوسيانين عند طول موجي 400 نانوميتر
P1	حروق	0.70	**P10**	جروح	0.93
P2	حروق	0.31	**P11**	جروح	0.82
P3	حروق	0.46	**P12**	جروح	0
P4	حروق	0.13	**P13**	جروح	0.60
P5	حروق	0.45	**P14**	تليف كيسي	0.08
P6	اذن	0	**P15**	تليف كيسي	0.65
P7	اذن	0.09	**P16**	تليف كيسي	0.21
P8	اذن	0.83	**P17**	تليف كيسي	0.23
P9	جروح	0			

- **العلاقة بين فعالية اللكتينات التلازنية وإنتاج إنزيم البروتيز والهيمولايسين وصبغة البايوسيانين:** أظهرت النتائج في الجدول (8) وجود علاقة طردية بين فعالية اللكتينات التلازنية لهذه العزلات وقابليتها على إنتاج إنزيم البروتيز والهيمولايسين وإنتاج صبغة البايوسيانين إذ ان العزلات ذات الفعالية التلازنية العالية تكون فعالة في إنتاج البروتيز والهيمولايسين والبايوسيانين، أما العزلات التي لم تظهر فعالية تلازنية فان إنتاجيتها لهذه العوامل تكون واطئة أو معدومة. اتفقت النتائج مع (35) التي وجدت ان العزلات التي أظهرت فاعلية تلازنية عالية تجاه كريات الدم الحمر كانت فعاله في نفس الوقت في قدرتها على إنتاج العوامل الأخرى وبالعكس. فسر (36) ان هذه الحالة تعود إلى وجود ارتباط وراثي ما بين هذه العوامل حيث ذكر ان انخفاض إنتاج اللكتينات يؤدي إلى انخفاض فعالية إنزيم البروتيز، في حين فسر (7) ان لكتينات البكتريا تعمل بالتآزر مع عوامل الضراوة الأخرى. فسر (37) ان هذه العلاقة قد تعود إلى الدور المهم الذي يلعبه إنتاج اللكتينات في السيطرة على إنتاج هذه العوامل وتحريرها إلى الوسط أو ربما يعود إلى اشتراك اللكتينات في إنتاج وتحفيز هذه العوامل.

جدول (8) العلاقة بين فعالية اللكتينات التلازنية لعزلات بكتريا *P. aeruginosa* وقابليتها على إنتاج إنزيم البروتيز والهيمولايسين وصبغة البايوسيانين

رقم العزلة	مصدر العزلة	عيارية التلازن الدموي للكتينات مع كريات الدم			فعالية البروتيز وحدة/ مليلتر	عيارية فاعلية انزيم الهيمولايسين	درجة الامتصاصية للبايوسيانين عند طول موجي 400 نانوميتر
		A	B	O			
P1	حروق	0	64	64	75	16	0.70
P2	حروق	32	0	4	53.5	4	0.31
P3	حروق	64	32	64	305	16	0.46
P4	حروق	0	0	0	55	2	0.13
P5	حروق	0	0	64	117.5	16	0.45
P6	اذن	16	4	4	23	0	0
P7	اذن	8	0	4	0	4	0.09
P8	اذن	0	64	32	115	32	0.83
P9	جروح	8	16	0	22.5	0	0
P10	جروح	128	64	64	340	32	0.93
P11	جروح	64	0	32	215	32	0.82
P12	جروح	16	8	0	5	0	0
P13	جروح	0	0	32	97.5	16	0.60
P14	تليف	32	0	0	17.5	0	0.08
P15	تليف	16	64	32	152.5	32	0.65
P16	تليف	4	16	8	56.5	4	0.21
P17	تليف	0	0	0	52.5	0	0.23

المصادر

1. Streeter, K. & 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. & 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. & 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., 26 (6): 463- 472.
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. & 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. & 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. & 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. & 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. & 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. & Heuch, C. C. (1991). Basik laboratory procedures in clinical Bacteriology. WHO. Geneva, Switzerland.
11. Mathur, T.; Singhal, S.; Khan, S.; Upadhyay, D. J.; Fatma, T. & Rattan, A. (2006). Detection of Biofilm Formation among The Clinical Isolates of *Staphylococci*: An Evaluation of Three Different Screening Methods. Indian J. Med. Microbiol., 24(1):25-29.
12. Bose, S.; Khodke, M.; Basak, S. & Mallick, S. K. (2009). Detection of biofilmproducing *Staphylococci*: need of the hour. J. Clin. Diag. Res., 3: 1915-1920.
13. Gilboa-Garber, N. (1982). *Pseudomonas aeruginosa* lectin. In methods in enzymology (ed. Ginsburg, V.). Academic press, New York. 83:378-383.
14. Whitaker, J. R. (1972). Principles of enzymology for the food science. Marcel Dekker, Inc., New York.
15. Wilson, R.; Pitt, T.; Taglor, G.; Watson, D.; Macdermot, J.; Sykes, D.; Roberts, D. & Cole, P. (1987). Pyocyanin and 1-Hydroxy phenazine produces by *Pseudomonas aeruginosa* inhibit the beating of human respiratory cilia Invitro. J. Clin. Invest., 79:221-229.
16. Brooks, C. F.; Carrol, K. C.; Butel, J. S. & Mores, S. A. (2007). JawetzMelnick- and Adelerg Medical Microbiology. 24th ed. McGraw- Hill. U.S.A.

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

18. Bouhr, D. D.; Jenkins, S. I. & 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.

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

20. 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., 13(3): 1681-6579.

21. 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.

22. عبد الله، رنا مجاهد ومهدي، عباس فالح. (2016). تشخيص بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* باستخدام جين 16Sr DNA. مجلة مركز بحوث التقانة الأحيائية. 1(10): 45-49.

23. Al-Salihi, S. S. & Hameed, B. H. (2014). Antibiosis resistant of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different clinical specimens. Kirkuk University Journal/ Scientific Studies, 9(2): 15-28.

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

25. 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.

26. Al-Kaisse, A. A.; Al-Thwani, A. N. & 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. J. Biotechnol. Res. Center, 9 (2): 67- 73.

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

28. Al-Saimary, E.; Al-Abbasi, M. & Najim, M. (2010). Impact of multi drug resistance bacteria on the Pathogenesis of chronic Suppurative otitis media. Acad. J., 4 (13): 1373-1382.

29. Ahmadi, K.; Hashemian, A. M.; Bolvardi, E. & Hosseini, P. K. (2016). Vancomycin-Resistant *Pseudomonase aeroginusa* in the Cases of Trauma. Med. Arch., 70(1):57-61.

30. المعيني، صفاء عبد لطيف. (2001). استخلاص وتوصيف اللكتينات من بعض المصادر المايكروبية. أطروحة دكتوراه، التقنيات الأحيائية، كلية العلوم- جامعة بغداد.

31. المشهداني، كوكب إدريس محمود حسين. (2004). دراسة تشخيصية وإمراضية لجرثومة *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من المصادر المختلفة في مدينة الموصل. رسالة ماجستير، كلية العلوم- جامعة الموصل.

32. ماجد، هدى زهير. (2005). العوامل المؤثرة على إنتاج الهيمولايسين في بكتريا مرضية معزولة من إدرار مرضى السكري ومقاومتها لبعض المضادات. رسالة ماجستير، كلية العلوم- الجامعة المستنصرية.

33. Opal, S. M.; Cross, A. S.; Genski, P. & Lyhte, L. W. (1990). Aerobactin and hemolysin as virulence determinants in *Escherichia Coli* isolated from human blood, urine and stool. J. Infect. Dis., 161 (1): 794-296.

34. Oleiwi, S. R. (2015). Study the Effect of Pyocyanin Extracted from *Pseudomonas aeruginosa* on DNA Fragmentation of Human Lymphocytes Cells. Iraqi J. Sci., 56(2B): 1366-1371.

35. العاني، زينب نوري حامد محمد. (2006). استخلاص وتنقية جزئية للكتينات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من حالات مرضية. أطروحة دكتوراه، كلية العلوم- الجامعة المستنصرية.

36. Sonawane, A.; Jyot, J. & Ramphal, R. (2006). *Pseudomonas aeruginosa* LecB is involved in pilus biogenesis and protease IV activity but not in adhesion to respiratory mucins. Infect. Immun., 74(12): 7035-7039.

37. Gilboa-Garber, N. (1986). Lectins of *Pseudomonas aeruginosa* properties, biological effects, and applications. In microbial lectins and agglutining (ed. Mirelman D). Jhon wiley and Sons, New York. PP. 256-268.

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