



جامعة الموصل
كلية العلوم

استخدام بعض المركبات العضوية في التثبيط الجيني لجرثومة
الزوائف الزنجارية المعزولة من جروح الكسور المفتوحة

زهراء خير الدين محي الدين المشهداني

أطروحة دكتوراه
علوم الحياة / أحياء مجهرية

بإشراف

الأستاذ المساعد الدكتور
محمود زكي سليمان الحسو

الأستاذ المساعد الدكتور
محسن ايوب عيسى العكيدي

الخلاصة:

تضمنت الدراسة عزل وتشخيص الأنواع الجرثومية المسببة لالتهابات جروح الكسور المفتوحة للمرضى المراجعين للعيادات الاستشارية، وردهاات جراحة العظام والكسور للمستشفى الجمهوري التعليمي ومستشفى السلام في محافظة نينوى خلال المدة من شهر شباط 2013 ولغاية شهر تموز 2013، إذ تم جمع (145) عينة من المرضى المصابين بالتهابات جروح الكسور المفتوحة أعطت (137) عينة منها نمواً جرثومياً، وكانت جرثومة *Staphylococcus aureus* الأكثر عزلاً من بين الجراثيم الموجبة لصبغة كرام وبنسبة (52.5%)، في حين كانت جرثومة *Pseudomonas aeruginosa* هي الأكثر عزلاً من بين الجراثيم السالبة لصبغة كرام وبنسبة (30.8%).

أظهرت نتائج اختبار الحساسية للمضادات الحيوية باستخدام طريقة الانتشار بالأقراص مقاومة مطلقة لمضادَي Amoxicillin Clavulinic acid و Amoxicillin في الجراثيم السالبة لصبغة كرام، إذ بلغت نسبة المقاومة لكل منهما (100%) وكانت الجراثيم الموجبة لصبغة كرام أكثر مقاومة لمضاد Cefpime وبنسبة (91,5%) في حين تباينت نسب المقاومة للمضادات الأخرى .

تم التحري عن تواجد انزيمات البيتا-لاكتاميز في العزلات الجرثومية جميعاً باستخدام الطريقة الحامضية إذ كانت (53%) من العزلات منتجة لها. و تم التحري عن قدرة الأنواع الجرثومية السالبة لصبغة كرام على انتاج انزيمات البيتا-لاكتاميز واسعة الطيف Extended β -lactamase spectrum (ESBL)، وانزيمات الـ AmpC بالطرائق المظهرية، وأوضحت النتائج أن عزلات جرثومة *P.aeruginosa* فقط كانت منتجة لانزيمات (ESBL)، فيما كانت (69.2%) من الجراثيم السالبة لصبغة كرام منتجات لانزيمات AmpC .

تم اختيار عزلات جرثومة *P.aeruginosa* أنموذجاً لإجراء التجارب اللاحقة، إذ حدد التركيز المثبط الأدنى Minimum Inhibitory Concentration (MIC) والتركيز المثبط لـ Inhibitory Concentration 50% (50%) لهذه العزلات تجاه مختلف أنواع المضادات الحيوية؛ إذ تراوحت قيم التركيز المثبط الأدنى بين (0.06-0.5) ملغم/مل، في حين تراوحت قيم التركيز المثبط (50%) منها بين (0.03-0.25) ملغم/مل .

استخدمت تقنية Polymerase Chain Reaction (PCR) للتحري عن تواجد الجينات المشفرة لانزيمات البيتا-لاكتاميز واسعة الطيف من نوع (CTX) وانزيمات الـ AmpC والانزيمات المعدنية Metallo β -lactamase (MBL) من نوع IMP في عزلات جرثومة *P.aeruginosa*، إذ أظهرت (8) عزلات نتيجة موجبة وبنسبة (33.3%) للجين *bla_{ctx}* في

حين أعطت (24) عزلة جرثومية نتيجة موجبة وبنسبة (100%) للجين *bla_{AmpC}* بينما سجلت (6) عزلات نتيجة موجبة وبنسبة (25%) للجين *bla_{IMP}*.

كما تم التحري عن تواجد جينات انظمة الضخ (Efflux pumps) (*mexR*, *mexB*, *mexA*, *mexX*, *mexY*, *mexZ*) في عزلات جرثومة *P.aeruginosa* باستخدام تقنية ال-PCR, وكانت النتائج موجبة بنسبة (100%) لكل من جينات *mexY*, *mexR*, *mexB*, *mexA* وبنسبة (29.2%) للجين *mexX*.

درس التأثير التثبيطي لعشرة مركبات عضوية محضرة تجاه عزلات هذه الجرثومة التي شملت المركبات الاسترية والمركبات الواهبة لأوكسيد النتريك، أوضحت النتائج قدرة متباينة في تثبيط نمو العزلات المختبرة؛ إذ أظهرت المركبات الاسترية 2-nitro ethyl-4-nitro benzoate, 2-chloro ethyl 4-nitro benzoate والمركب الواهب لاوكسيد النتريك (1-nitroxy) , propan-2-yl-4-chloro benzoate تأثيراً تثبيطياً واضحاً على جميع عزلات جرثومة *P.aeruginosa* المختبرة، في حين أظهرت بقية المركبات تأثيراً تثبيطياً أقل على نمو بعض العزلات الجرثومية المختبرة ولم يظهر مركب ال-Indol تأثيراً على أي من العزلات الجرثومية المختبرة ضمن التراكيز المستخدمة .

حدد التركيز المثبط الأدنى (MIC) والتركيز المثبط لـ 50% من الجراثيم (IC50) للمركبات العضوية الثلاثة المؤثرة والمذكورة في أعلاه؛ إذ تراوحت قيم التركيز المثبط الأدنى بين (1.6-2) ملغم/مل، في حين تراوحت قيم التركيز المثبط لـ 50% من الجراثيم بين (1.2-1.8) ملغم/مل. عندما درس تأثير معاملة عزلات جرثومة *P.aeruginosa* بالمركبات الكيميائية المدروسة والمؤثرة أظهرت النتائج امكانية تحول هذه العزلات من حالة المقاومة الى حالة الحساسية للعديد من المضادات الحيوية المختبرة عند إجراء فحص الحساسية لها بطريقة الانتشار بالأقراص .

درس تأثير المعاملة بالمركبات الكيميائية الثلاثة المؤثرة جزئياً على الجينات المدروسة باستخدام تقنية PCR , إذ أظهرت النتائج تأثير المركب 2-chloro ethyl-4-nitro benzoate في تعطيل أو إزالة الجين (*bla_{IMP}*) بينما لم يظهر اي تأثير تجاه بقية الجينات، في حين أظهر المركب 2-nitro ethyl 4-nitro benzoate تأثيراً في تعطيل أو إزالة كل من جيني (*bla_{AmpC}*) و(*bla_{ctx}*) ولم يظهر أي تأثير على بقية الجينات المختبرة.

بينما أظهر المركب 1-(nitroxy)propan-2-yl-4-chloro-benzoate تأثيراً فعالاً في تعطيل أو إزالة كل من جينات *mexB* و*mexY* و*bla_{IMP}*، في حين لم يظهر أي تأثير على بقية الجينات المختبرة , إذ تشير هذه النتائج إلى امكانية استخدام هذه المركبات بعد إجراء دراسات تفصيلية عليها في معالجة مشكلة المقاومة الجرثومية للعلاجات .

**University of Mosul
College of Sciences**



**Using of Some Organic Compounds in the
Genetic Inhibition of *Pseudomonas
aeruginosa* Isolated from Open Fractures
Wounds**

Zahraa Khairi-Aldeen Mohi-Aldeen Al-Mashhadani

Ph.D. Thesis
Biology/Microbiology

Supervised by

**Assist. Prof. Dr.
Muhsin A. E. Al-Ogaidy**

**Assist. Prof. Dr.
Mahmood Z. S. Al-Hasso**

1439 A.H.

2018 A.D

Summary

This study included isolation and identification of microbial species that cause open fracture wound infections of the patients intended to the clinics of Republic Hospital and Al-Salam hospital in Nineveh Province . 145 specimens were collected , 137 of them revealed a microbial growth with Gram positive *Staphylococcus aureus* represent 52.5% while the *Pseudomonas aeruginosa* represent the most Gram negative with 30.8%.

The results revealed that the sensitivity test against antibiotics using disk diffusion method had absolute resistance to both Amoxicillin and Amoxicillin clavulanic acid of Gram negative isolates with rates approaching 100% and Gram positive was more resistance to cefipime with rates of 91.5% while ratios varied to other antibiotics.

The study also investigates the presence of Beta lactamase enzymes in the isolated bacteria using acidimetric method with which gave apposite rate of 53%. Investigation also included the ability of Gram negative bacteria to produce extended spectrum beta lactamase and AmpC enzymes using morphological methods, the results proofed that *P.aeruginosa* isolates were producing of ESBL enzyme while 69.2% of Gram negative was producing AmpC.

P.aeruginosa isolates were selected for further study in which the determination of minimum inhibitory concentration were determined for all isolates toward various antibiotic with range of (0.5- 0.06) mg/ml, while the value of inhibitory concentration (50%) among them with range of (0. 25- 0.03) mg/ ml.

Polymerase chain reaction (PCR) technical investigate was used to detect the occurrence of genes encoded extended spectrum Beta lactamase (CTX) AmpC enzymes in addition to Metallo- β -Lactamase (MBL) of IMP type among bacterial isolate of *P.aeruginosa*. Eight of these isolates yielded positive results with ratio of 33.3% of gene *bla_{CTX}* ,

(24) isolates gave positive result (100%) for *bla_{AmpC}*, while 6 isolates gave positive result with 25% for the gene *bla_{IMP}*.

Also the occurrence of Efflux pumps genes (*mex R.*, *mex A*, *mex B.*) and (*mex Z*, *mex Y*, *mex X*) was detected with a ratio of (100%) for (*mex R.*, *mex A*, *mex B.*) and (*mex Z*, *mex Y*) and of (29.2%) for *mex X*.

The inhibition effect of the organic compound previously prepared was evaluated against these isolates, the compounds involved ester compounds and nitric oxide compounds. The results showed variable inhibition ability against isolates tested; the 1-nitroxy, 2-nitroethyl-4-nitro benzoate, 2-chloro ethyl 4-nitro benzoate, propan-2-yl-4-chloro benzoyl compounds gave obvious inhibitory effect against all isolates of *P.aeruginosa* examined, while other compounds show less inhibitory effect on the growth of the isolates, but indol has no effect upon any isolates examined in the concentration of the compounds.

The minimum inhibitory concentrations (MIC) and 50% inhibitory concentrations (IC₅₀) of the three organic compounds mentioned above were determined. MICs were between (2-1.6) mg/ml while the inhibitory of 50% were between 1.2- 1.8 mg/ml.

P.aeruginosa isolates treated with the effective chemical compounds showed sensitivity to antibiotics they were resistant to before treatment with the compounds.

The effects of chemical compound were studied on the molecular level using PCR techniques. The results showed that 2-chloro ethyl 4-nitrobenzoate inactivated or removed the gene *bla_{IMP}* while it had no effect on the other genes. The compound 2-nitro ethyl 4-nitro benzoate inactivated or removed the genes *bla_{CTX}* and *bla_{AmpC}* only. While the compound 1(nitroxy)propane-2-yl-4-chloro-benzoate showed an inactivating effect on the genes *mexB*, *mexY* and *bla_{IMP}*. These results indicate the possibility of using such chemical compounds in detailed studies for encountering antimicrobial resistance problem.