

التحليل الوراثي للمورث 16S rRNA لأنواع *Burkholderia cepacia complex* المعزولة من مصادر سريرية مختلفة

حازم محمد ابراهيم الجرجري

مركز صحي فايذة/ دائرة صحة نينوى/ وزارة الصحة

إسراء غانم حازم السماك

قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة الموصل

p-ISSN: 1608-9391
e-ISSN: 2664-2786

Article information

Received: 14/10/2022

Revised: 25/ 11/ 2022

Accepted: 30/11/2022

DOI: 10.33899/rjs.2023.180288

corresponding author:

حازم محمد ابراهيم الجرجري

hazim.20scp58@student.uomosul.edu.iq

الملخص

جمعت 250 عينة مرضية من مصادر سريرية مختلفة للمرضى من كلا الجنسين للفترة من تشرين الأول 2021 ولغاية ايار 2022، استحصلت هذه العينات من مستشفيات عدة في مدينة الموصل (مستشفى الجمهوري التعليمي، ومستشفى السلام التعليمي، ومستشفى ابن سينا التعليمي، ومركز الموصل التخصصي للحروق والجراحة التجميلية؛ ومركز صحي فايذة). بلغ عدد العينات التي لم تظهر أي نمو بكتيري 47 عينة من مجموع 250 عينة ونسبة 18.8% يقابلها 203 عينة ونسبة 81.2% للعينات التي أظهرت نمواً بكتيرياً على وسط اكار الماكونكي، أكد التشخيص باستخدام وسط Oxidation Fermentation Polymyxin Bacitracin Lactose Agar (OFPBL)، إذ شخصت 18 عزلة على انها تابعة Bcc وبلغت نسبة العزل 7.2% من إجمالي 250 عينة مرضية، شملت (6) 2.4% من الحروق، (4) 1.6% من الجروح، (3) 1.2% من الادرار، (3) 1.2% من قرحة القدم السكرية، (2) 0.8% من القشع. امتازت عزلات Bcc على انتاج عوامل الضراوة منها انزيم اليوريز، انتاج الطبقة الهلامية، انتاج الغشاء الحيوي، انتاج انزيم الجيلاتينيز وانتاج الهيموليسين حيث بلغت النسب لعدد العزلات المنتجة لها 21 (100%)، 21 (100%)، 21 (100%)، و 10 (47.6%) على التوالي.

استخدم البادئ العام 16S rRNA في التشخيص الجزيئي لعدد 21 عزلة مشخصة مظهرياً؛ إذ ظهرت الحزم مقارنة مع الدليل الحجمي بوزن جزيئي 1300 زوج قاعدي قورنت نتائج تحديد التتابعات لهذه العزلات مع تسلسل المورث للعزلات القياسية المثبتة في اداة البحث Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) لمعرفة نسبة التشابه بين تسلسلات القواعد النكليوتيدية ضمن الـ National Center for Biotechnology Information (NCBI) عند مقارنة نتائج التتابعات؛ إذ شخصت العزلات على أنها تعود إلى *Burkholderia cepacia complex* وينسب تشابه تراوحت بين 85-98%. تم الحصول على مخطط شجري توزعت فيه السلالات التابعة لمجموعة Bcc ضمن خمسة عناقيد A,B,C,D,E عند نسبة تشابه 97% للعنقود A وعند نسبة تشابه 97.4% للعنقود B ونسبة تشابه 97.8% للعنقود C، وعند مستوى تشابه 97.6% للعنقود D بينما شمل العنقود E على عزلة واحدة ارتبطت عند 95% باستخدام طريقة المعدل غير الموزون UPGMA وبرنامج Mega7، كما سجلت السلالتين HE2 و HE14 ضمن بنك الجينات وعند الرقم التسلسلي OP218012 و OP218010 على التوالي. تبين أن هذه البكتيريا مقاومة للعديد من المضادات الحيوية إلا أنها أبدت نوعاً من الحساسية تجاه المضاد الحيوي الميروبيبيم. كما توافق مقاومة البكتيريا المتعددة للمضادات الحيوية مع امتلاكها لمضخات الدفع efflux pump.

الكلمات الدالة: BCC, OFPBL, 16S rRNA, BLAST.

المقدمة

مجموعة *Burkholderia cepacia complex* (Bcc) عبارة عن بكتريا عصوية الشكل سالبة لصبغة كرام، غير مكونة للسبورات، متحركة موجبة للكتاليز وغير مخمرة لللاكتوز (Alnasrawy and AL-Aammar, 2021) سلالات *Burkholderia* المسماة معقد *Burkholderia cepacia* (Bcc) تضم أنواع تظهر تشابهاً عالياً في التسلسل لمورث 16S rRNA؛ ومنها النوع *Burkholderia cepacia* (Horinouchi et al., 2010) تضم Bcc أكثر من 24 نوعاً متقاربة وهي انتهازية ممرضة وغالباً ما تكون مكتسبة من المستشفيات nosocomial origin (Kwayes et al., 2022) وتوصف بأنها ملوثات رئيسة للمستحضرات الصيدلانية المعقمة ومنها الأدوية والمحاليل الوريدية والمستحضرات الصيدلانية منها بخاخات الأنف، والمنتجات الدائبة في الماء، وغسول الفم، والمعقمات وهي المسببة للعديد من حالات تفشي عدوى المستشفيات المسجلة على مدى العقود الماضية (Moehring et al., 2014; Rastogi et al., 2019) تسبب *Burkholderia cepacia complex* التهابات مجرى الدم bloodstream infections والالتهاب الرئوي Pneumonia والتليف الكيسي Cystic Fibrosis والتهاب المسالك البولية والمفاصل (Chang et al., 2021). تمتلك عوامل ضراوة تمكنها من الاستعمار والعدوى الناجم عن مقاومتها الواسعة للمضادات الحيوية، وأكثر الأشخاص المعرضين للإصابة هم الراقدون في وحدات العناية المركزة لفترات طويلة ومستخدمي جهاز التنفس الصناعي mechanical ventilation، والأجهزة داخل الأوعية الدموية intravascular devices، والأشخاص الذين يعانون من نقص في المناعة immunocompromised host (Lara-Oya, 2022).

وتعزل أيضاً من مجموعة متنوعة من المصادر البيئية، ليس لها متطلبات غذائية محددة ويمكن أن تعيش لأشهر في الماء والأحواض والمحاليل المطهرة (الكلوروكسيدين والأمونيوم الرباعي والبوفيدون اليودي Povidone-iodine)، و (Wisplinghoff, 2017). يمكن أن تنمو المستعمرات على وسط أكار الماكونكي MacConkey والأوساط الانتقائية مثل Oxidation Fermentation Polymyxin Bacitracin Lactose Agar (OFPBL) *P.cepacia* agar (PCA) Base. تعد مجموعة *B.cepacia* مقاومة للأمينوغليكوزيد aminoglycoside والبوليميكسين polymyxin وأيضاً مجموعة البيتا لاكتام Beta lactam (Wanger et al., 2017) تمتلك مجموعة Bcc مقاومة طبيعية للعديد من العوامل المضادة للميكروبات بما في ذلك polymyxin، carboxypenicillins، والaminoglycosides بسبب نشاط مضخة الدفع efflux pump (Sfeir, 2018).

هدف هذا البحث الى تحديد العلاقة بين العزلات بدراسة تحليل تتابع 16S rRNA مقارنة بالصفات المظهرية.

مواد العمل وطرائقه

تم زراعة المسحات المستحصلة على وسط الماكونكي MacConkey ووسط OFPBL الاختياري لبكتريا *Burkholderia cepacia* وكذلك وسط اكار الدم Blood Agar وحضنت هوائياً في درجة حرارة 37 م لمدة 24-48 ساعة (Tille, 2015) فُحصت العزلات مجهرياً لملاحظة اشكال الخلايا البكتيرية وتفاعلها مع صبغة كرام Riedel et al., (2019). أُجريت مجموعة من الاختبارات الكيموحيوية اللازمة لتشخيص العزلات البكتيرية قيد الدراسة منها الاوكسديز والكتاليز ومجموعة اختبارات IMViC والحركة (MacFaddin, 2000) كذلك تم التحري عن انتاج سلالات Bcc لبعض عوامل الضراوة منها انتاج انزيم اليوريز (Brown et al., 2014)، تسهيل الجيلاتين (Krieg, 1984)، الهيمولاييسين (Buxton, 2005)، الطبقة الهلامية من خلال زراعة العزلات على أطباق أكار الكونغو الاحمر (Congo Red Agar) (Abbey et al., 2021). وتكوين الغشاء الحيوي باستخدام انابيب الاختبار (Kırmusaoglu, 2019).

التشخيص الجزيئي

تم استخدام عدة الاستخلاص الخاصة بشركة Geneaid لاستخلاص الـ DNA لبكتريا *Burkholderia cepacia* استخدم البودائ العامة لمورث 16S rRNA لتحديد تتابعات العزلات قيد الدراسة كما في (الجدول 1)؛ إذ جهزت هذه البودائ من شركة Alpha DNA الكندية وبشكل مجفد Lyophilized form أذيب البادئ بماء مقطر مزال الايونات Deionized Water للحصول على تركيز 100 μ M كمحلول خزين يخفف لاحقاً للحصول على تركيز 10 بيكامول.

الجدول 1: البودائ العامة لتحديد تتابعات العزلات قيد الدراسة

المصدر	الناتج (زوج قاعدي)	تتابع البادئ Primer sequence 5'-3'	البادئ
Cotârlet <i>et al.</i> , 2010	1300	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG ATGGACCAGGCCACGATTTT	16S rRNA (F) Universal 16S rRNA (R) Universal

حُضِر مزيج تفاعل سلسلة البلمرة كما موضح في (الجدول 2).

الجدول 2: مكونات مزيج تفاعل انزيم البلمرة PCR reaction mixture وحجومها

الحجم / مايكروليتر	مزيج التفاعل
3 مايكروليتر	مستخلص الحامض النووي بتركيز 50 نانوغرام
10 مايكروليتر	محلول مزيج التفاعل Green master mix
1 مايكروليتر	forward Primer البادئ الامامي
1 مايكروليتر	reverse Primer البادئ الخلفي
10 مايكروليتر	ماء منزوع الايونات
25 مايكروليتر	المجموع

بعد إكمال تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمرة مُزجت بعناية بجهاز المازج vortex لمدة 10 ثوان. نُقلت الأنابيب لجهاز PCR Thermocycler لإجراء الدورات الحرارية PCR thermocycler condition وحسب البرنامج في (الجدول 3).

الجدول 3: الظروف المستعملة في جهاز المضخم الحراري PCR لتضخيم المورث 16S rRNA العام

ت	المرحلة	الحرارة	الوقت	عدد الدورات
1	المسخ الاولي Initial Denaturation	95	6 دقيقة	1
2	المسخ Denaturation	95	45 ثانية	35
3	الارتباط Annealing	55	1 دقيقة	
4	الاستطالة Extension	72	1 دقيقة	
5	الاستطالة النهائية Final Extension	72	5 دقيقة	1

(Cotârlet *et al.*, 2010)

أجري الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاغاروز بنسبة 2% وذلك لقراءة نتيجة تفاعل سلسلة البلمرة PCR product بإذابة 1 غم من الاغاروز Agarose في 50 مليلتر من محلول الـ TBE buffer الدارئ بتركيز 1X.

استخدم سلم القياس 100 DNA ladder لقياس ناتج PCR ووضع في الحفرة الأولى. بعد اكتمال عملية التحميل، عُمر هلام الاغاروز باستخدام محلول TBE Buffer الدارئ بتركيز 1X وغلقت غطاء الترحيل وبعدها شغل جهاز الترحيل باستخدام تيار 80 امبير و 100 فولت لمدة ساعة واحدة.

فحص الهلام الحاوي على ناتج الـ PCR باستخدام مصدر الأشعة فوق البنفسجية U.V light source. تم ارسال ناتج تفاعل PCR للمورث 16S rRNA الى شركة Macrogen في كوريا الجنوبية وذلك لأجراء تسلسل الحامض النووي باستخدام جهاز AB DNA sequencing system شخصت العزلات مقارنة بالعزلات ضمن موقع NCBI.

تم تحديد العلاقة بين السلالات قيد الدراسة وذلك من خلال تحليل الشجرة الوراثية Phylogenetic tree analysis باستخدام برامج Mega7 والتعنقد cluster بطريقة المعدل غير الموزون Unweighted Pair-Group Average Method (Sneath and Sokal, 1973; Tamura et al., 2004; Kumar, 2016).

اختبرت حساسية العزلات البكتيرية بطريقة الانتشار بالأقراص اعتمادا على طريقة (Bauer et al., 1966) و CLSI (2021)، وتضمنت المضادات (1.25+23.75),SXT(10),MEM(10),CAZ(30),LEV(5),CN(10),TE(10) و NE(10),VA(30) من شركة Bioanalyse (Turkey).

تم التحري المظهري عن وجود مضخات الدفع efflux pump باستخدام طريقة العجلة الخشبية المحورة ethidium bromide - agar cartwheel method باستخدام تراكيز مختلفة من صبغة ethidium bromide (Al-Saadi and Abdullah, 2019).

النتائج والمناقشة

شخصت لاحقا 18 عزلة تابعة لمجموعة Bcc من مجموع 250 عينة من خلال عملية التشخيص بالاعتماد على الصفات المظهرية للعزلات المزروعة حيث استبعدت العزلات النامية على وسط الماكونكي المخمرة لللاكتوز وتم الاحتفاظ بالعزلات البكتيرية غير المخمرة لللاكتوز وكذلك التي اعطت نمو على الوسط الانتقائي OFPBL الخاص بها وتم اجراء الفحص المجهرى بالإضافة للاختبارات الكيموحيوية الاولية وهما فحص الاوكسيديز والكتاليز وكما موضح في (الجدول 4) حيث بلغت نسبة العزلات التي تم الحصول عليها 7.2% من إجمالي 250 عينة مرضية، شملت (6) 2.4% من الحروق، (4) 1.6% من الجروح، (3) 1.2% من الادرار، (3) 1.2% من قرحة القدم السكرية، (2) 0.8% من القشع. نسبة 61% من العزلات كانت من المرضى الإناث بينما النسبة 39% من المرضى الذكور. ايضاً تم الحصول على 3 عزلات جاهزة ومشخصة من احدى المختبرات الاهلية (عزلتان من مرضى مصابين بتجرثم الدم Bacteremia عزلة من السائل النخاع الشوكي CSF لمريض مصاب بالتهاب السحايا meningitides).

الجدول4: نسبة عزل Bcc اعتماداً على نوع العينة

النسبة اعتماداً على نوع العينة	النسبة والعدد اعتماداً على نوع العينة		نسبة العزل الى العدد الكلي للعينات	عدد العينات Bcc	عدد العينات	نوع العينة	ت
	اناث	ذكور					
%33	%22 (4)	%11(2)	%2.4	6	75	Burns حروق	1
%22	%11(2)	%11(2)	%1.6	4	63	Wounds جروح	2
%17	%6 (1)	%11(2)	%1.2	3	17	قرحة القدم السكرية Diabetic Foot Ulcer	3
%17	%11 (2)	%6 (1)	%1.2	3	25	ادرار Urine	4
%11	%11(2)	%0 (0)	%0.8	2	20	Sputum قشع	5
% 0	% 0	% 0	% 0	0	81	مسحة حلق Throat swab	6
% 0	% 0	% 0	% 0	0	14	سائل النخاع الشوكي Cerebrospinal Fluid	7
% 0	% 0	% 0	% 0	0	18	عينات ادرار من مرضى الفشل الكلوي	8
%100	%61	%39	%7.2	18	502	العدد الكلي Total No.	
عزلتان مشخصة من مختبر خارجي						Blood دم	
عزلة واحدة مشخصة من مختبر خارجي						سائل النخاع الشوكي Cerebrospinal Fluid	

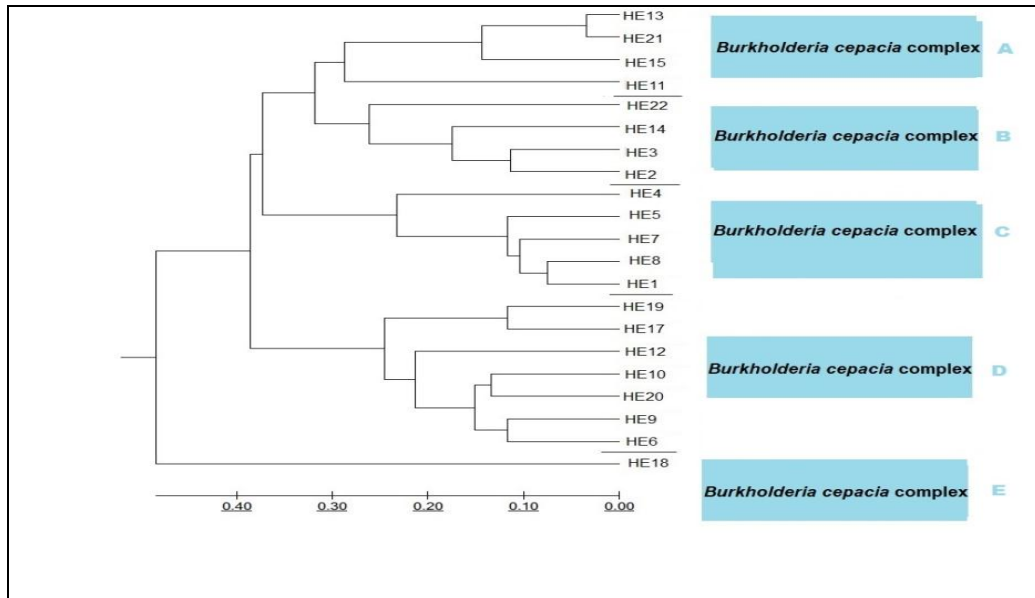
استخدم البادئ العام 16S rRNA في التشخيص الجزيئي للعزلات الـ 21 التي تم تشخيصها مظهرياً؛ إذ ظهرت الحزم مقارنة مع الدليل الحجمي بوزن جزيئي 1465 زوج قاعدي وكما موضح في الشكل (1).



الشكل 1: نواتج تضخيم تفاعل PCR لعزلات Bcc للمورث 16S rRNA عند ناتج 1465 زوج قاعدي، باستخدام الدليل الحجمي M (1000 زوج قاعدي).

قورنت نتائج تحديد التتابعات لهذه العزلات مع تسلسل المورث للعزلات القياسية المثبتة في اداة Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) ضمن الـ NCBI عند مقارنة نتائج التتابعات؛ إذ شخصت العزلات على أنها تعود إلى *Burkholderia cepacia* complex وينسب تشابه تراوحت بين 85-98%.

توزعت السلالات التابعة لمجموعة *Burkholderia cepacia* complex ضمن خمسة عناقيد A, B, C, D, E كما موضح في الشكل (2) عند نسبة تشابه 97% للعنقود A وعند نسبة تشابه 97.4% للعنقود B وبنسبة تشابه 97.8% للعنقود C، وعند مستوى تشابه 97.6% للعنقود D بينما شمل العنقود E على عزلة واحدة ارتبطت عند 95% باستخدام طريقة المعدل غير الموزون UPGMA وبرنامج Mega 7؛ إذ أظهرت هذه السلالات تغيراً كبيراً في صفاتها المظهرية و الموضحة في (الجدول 5)، كما سجلت السلالة HE2 و HE14 ضمن بنك الحينات وعند الرقم التسلسلي OP218010 و OP218012 على التوالي.



الشكل 2: العلاقة التطورية للعزلات قيد الدراسة باستخدام طريقة المعدل غير الموزون

UPGMA ضمن برنامج Mega 7

اخضعت جميع عزلات Bcc (21) عزلة في هذه الدراسة لفحص الحساسية تجاه عدد من المضادات الحيوية والبالغة 9 أنواع مختلفة التي تعود لعدة أصناف؛ وكانت النتائج حسب (الجدول 5).
فيما كانت عزلة واحدة فقط حساسة لمعظم المضادات المستخدمة في هذه الدراسة. والشكل (3) يبين مقاومة عزلات Bcc لمضادات حيوية مختلفة مستخدمة في الدراسة.



الشكل 3: مقاومة عزلات Bcc للمضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة

أظهرت عزلات Bcc في العناقيد الخمسة ضمن المخطط نسبة عالية من المقاومة للمضاد الحيوي chloramphenicol؛ إذ بلغت 80-100% وهي مقارنة لدراسة Hamad (2018) التي أشارت إلى أن مقاومة هذا المضاد بلغ 74.3% في حين كانت مغايرة لما ذكرته دراسة محلية للباحث Abbas (2017) الذي ذكر فيها أن نسبة الحساسية لهذا المضاد بلغت 86.6%. أما المضاد الحيوي Trimethoprim/Sulfamethoxazole فكانت نسبة مقاومة العزلات في العنقود A و E 100% بينما كانت للعنقود D 71.5% وهذه النسب خالفت الدراسة السابقة للباحث (Abbas, 2017) والتي ذكر فيها أن نسبة الحساسية لهذا المضاد بلغت 73.3% بينما كانت مقارنة للعناقيد B و C والتي كانت 50% و 40% على التوالي. قاومت عزلات Bcc في العناقيد A و B و C بنسبة 100% لكل عنقود المضاد الحيوي Levofloxacin بنسبة بينما كانت 20%، 57% للعنقودين C و D على التوالي و في دراسة (Abbas, 2017) كانت مقاومة بنسبة 73.3% بينما في دراسة (Shukla *et al.*, 2018) نسبة مقاومة عزلات Bcc بلغت 46.5%، أما في دراسة (Nguema *et al.*, 2021) فكانت الحساسية لهذا المضاد 100%. قاومت عزلات Bcc مضاد Ceftazidime في العناقيد A و B و C و D بنسبة 50%، 75%، 0%، 43% و 0% على التوالي غير انها كانت في دراسة هندية (Shukla *et al.*, 2018) بلغت 27.9%. كذلك في هذه الدراسة فإن مقاومة العزلات للمضاد الحيوي Gentamicin كانت بنسبة 100%، 100%، 20%، 43% و 0% للعناقيد A و B و C و D و E على التوالي اما في دراسة محلية للباحث (Hamad, 2018) كانت النسبة 42.1% أما المضاد الحيوي Tetracycline في الدراسة الحالية فكانت نسبة مقاومة العزلات عالية بلغت 80-100% لجميع العناقيد في المخطط الشجري وهي مطابقة لدراستين محليتين أشارتا إلى المقاومة بنسبة 100% (Hasan, 2017; Hamed, 2015). وفي الدراسة الحالية كانت أعلى حساسية للعزلات تجاه المضاد الحيوي Meropenem؛ إذ بلغت المقاومة 100% لسلاسل العنقود A فيما كانت 0% للعنقودين B و E على التوالي اما العنقودين C و D فكانت النسب 20-43% على التوالي حيث كانت في دراسة هندية حساسية عزلات Bcc فيها لهذا المضاد 48.8% (Shukla *et al.*, 2018) وفي دراسة Hamad (2018) كانت نسبة الحساسية لهذا المضاد 94.7%.

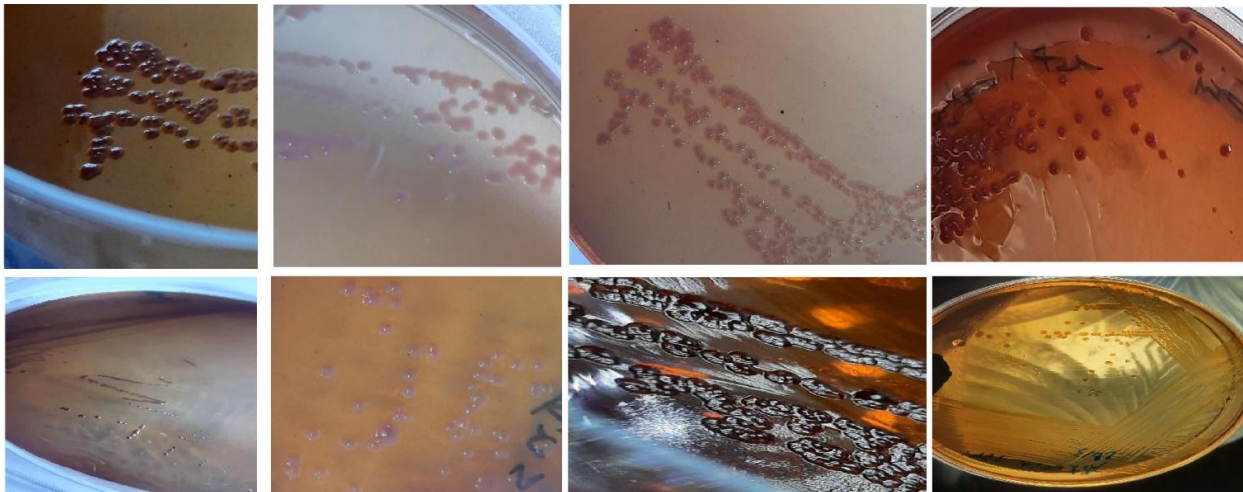
الجدول 5: الصفات المظهرية لعزلات Bcc ضمن العناقيد للشجرة التطورية الشكل (2)

العناقيد					مصادر العزل
E	D	C	B	A	
عدد السلالات					
1	7	5	4	4	
0%	28.5%	40%	0%	50%	الحروق
0%	28.5%	0%	25%	25%	الجروح
0%	14.5%	20%	25%	0%	قرحة القدم السكري
100%	0%	0%	25%	25%	الادرار
0%	28.5%	0%	0%	0%	القشع
0%	0%	0%	25%	0%	سائل النخاع الشوكي
0%	0%	40%	0%	0%	دم
العناقيد					الصفات الشكلية
E	D	C	B	A	مستعمرات Bcc على وسط الماكونكي
عدد السلالات					
1	7	5	4	4	
100%	14%	0%	25%	50%	مستعمرات وردية فاتحة مرتفعة ملساء منتظمة الحواف
100%	0%	0%	75%	50%	مستعمرات وردية لزجة مرتفعة ذات حافات منتظمة

%0	%0	%40	%0	%0	مستعمرات مسطحة وردية فاتحة ذات حافات غير منتظمة
%0	%43	%60	%0	%0	مستعمرات وردية الى بنفسجية لماعة ذات حافات منتظمة ومسطحة
%0	%43	%0	%0	%0	مستعمرات وردية لماعة ذات مركز داكن مرتفع وحافات منتظمة
%100	%100	%100	%100	%100	مستعمرات BCC على وسط اكار دم الانسان
					مستعمرات بيضاء ملساء
%100	%85.7 ملساء %14.3 مجعدة	%100	%100	%100	مستعمرات BCC على وسط OFPBL
					مستعمرات صفراء صغيرة
العناقيد					الاختبارات الكيموحيوية
E	D	C	B	A	
عدد السلالات					
1	7	5	4	4	
%100	%100	%100	%100	%100	
%100	%100	%100	%100	%100	الاوكسيديز
%100	%100	%100	%100	%100	الكتاليز
%0	57.1%	%60	%75	%100	الجيلاتينيز
%100	%100	%100	%100	%100	اليوريز
%0	%0	%0	%0	%0	الاندول
%0	%0	%0	%0	%0	المثيل الاحمر
%0	%0	%0	%0	%0	فوكاس برسكاور
%100	%71.5	%100	%100	%75	استهلاك السترات
%100	%100	%100	%100	%100	الطبقة الهلامية
%100	%100	%100	%100	%100	تكوين الغشاء الحيوي
%100	%100	%100	%100	%100	الحركة
%100	%71.5	100%	%100	%75	TSI
%0	%28.5	%0	%0	%25	K/K K/A
%100	%100	%100	%100	%100	H ₂ S
%100	%100	%100	%100	%100	الرائحة SMELL Dirt like
%100	%100	%100	%50	%100	النمو عند 42 م
%0	%71.5	%20	%0	%50	انتاج الهيمولايسن
العناقيد					المقاومة للمضادات الحيوية mg/disc
E	D	C	B	A	
عدد السلالات					
1	7	5	4	4	
%0	%43	%20	%0	%100	
%100	%71.5	%40	%50	%100	MEM10
%0	%43	%0	%75	%50	SXT 25
					CAZ30

%100	%57	%20	%100	%100	LEV5
%100	%100	%80	%100	%100	C10
%100	%100	%80	%100	%100	TE10
%0	%43	%20	%100	%100	CN10
%100	%100	%80	%100	%100	N10
%100	%100	%100	%100	%100	VA30
العناقيد					مضخة الدفع
E	D	C	B	A	تراكيز صبغة بروميد الأثديوم المستعملة (مايكروغرام/مليلتر)
عدد السلالات					
1	7	4	4	4	
%100	%100	%60	%100	%100	5
%100	%43	%0	%50	%50	10
%0	%0	%0	%0	%0	15
%0	%0	%0	%0	%0	20
%0	%0	%0	%0	%0	25
100% موجبة للفحص او مقاومة للمضاد، 0% سالبة للفحص او حساسة للمضاد					

اظهرت العزلات التابعة لمجموعة Bcc تغييراً كبيراً في صفاتها المظهرية على وسط الماكونكي وكما موضح في (الجدول 5) والشكل (4).



الشكل 4: مستعمرات Bcc على وسط الماكونكي

الاستنتاجات

التشخيص عن طريق تحليل تتابع مورث 16S rRNA العام مفيد لتشخيص *Burkholderia cepacia* على مستوى المجموعة (Bcc) وإيجاد العلاقة باستخدام الشجرة التطورية تبين أن هذه البكتيريا مقاومة للعديد من المضادات الحيوية إلا أنها أبدت نوعاً من الحساسية تجاه المضاد الحيوي Meropenem.

المصادر

- Abbas, A.F. (2017). Antibiotic susceptibility patterns of *Burkholderia cepacia* isolated from different clinical specimens. *J. Babyl. University Pure Appl. Sci.*, **25**(2), 461-72.
- Abbey, S.D.; Wachukwu, C.K.; Nwokah, E.G.; Horsfall, S.J. (2021). Extended-spectrum β -lactamase enzymes (ESBLs) and slime production of some gram-negative bacilli isolated from human, animal and environmental sources in Port Harcourt, Nigeria. *South Asian J. Research in Microbiol.*, **11**, 24-34.
- Al-Saadi, Z.H.; Abdullah, R.M. (2019). Phenotypic and molecular detection of *Escherichia coli* efflux pumps from Ute patients. *Biochem. and Cellul. Arch.*, **19**(1), 2371-2376.
- Alnasrawy, W.D.; AL-Aammar, M.H. (2021). A molecular study with A comparison of the odds of diagnostic methods for *Burkholderia cepacia* bacteria isolated from patients with diabetic foot ulcer. *Indian J. Forensic Medic. Toxicol.*, **15**(3), 4603.
- Bauer, A.W.; Kirby, W.M.; Sherris, J.C.; Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American J. Clin. Pathol.*, **45**(4), 493-496.
- Chang, T.H.; Chuang, Y.C.; Wang, J.T.; Sheng, W.H. (2021). Clinical characteristics and outcomes of non-cystic fibrosis patients with *Burkholderia cepacia* complex bacteremia at a medical center in Taiwan. *J. Microbiol., Immunol. and Infection.*, S1684-1182(21), 00198-5. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2021.09.009>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2021). "M100-S31. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing." 31st ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Malvern, PA.UK.
- Cotârlet, M.; Bahrim, G.; Negoita, T.; Stougaard, P. (2010). Comparative study of establishing the efficiency of some methods for chromosomal DNA extraction from cold adapted *Streptomyces*. *Romanian Biotechnol. Lett.*, **15**(4), 5482-5486.
- Hamad, M.O. (2018). Clinical study of *Burkholderia cepacia* isolated from body infections. *Plant Archives.*, **18**(1), 65-72.
- Hasan, R. (2017). Isolation and characterization of *Burkholderia cepacia* from respiratory infections. *Internat. J. Appl. Biol. and Forens.*, **1**(2),31-34.
- Horinouchi, S.; Ueda, K.; Nakayama, J.; Ikeda, T. (2010). "Cell-to-Cell Communications Among Microorganisms". In: Mander, L., Liu, H.W. (eds). *Comprehensive natural products II*, vol. 4. The Elsevier Science., Amsterdam, The Netherlands. pp. 283-337. <https://doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00098-8>.
- Kirmusaoğlu, S. (2019). The methods for detection of biofilm and screening antibiofilm activity of agents. In (Ed.), *antimicrobials, antibiotic resistance, antibiofilm strategies and activity methods. Intech Open.*, <https://doi.org/10.5772/intechopen.84411>.
- Krieg, N.R. (1984). Enrichment and isolation: in manual of methods for general bacteriology. *J. Gene. Microbiol.*, **54**, 143-153.
- Buxton, R. (2005). "Blood Agar Plates and Hemolysis Protocols. American Society for Microbiology". Washington, DC USA. Available online at: <https://www.asm.org/getattachment/7ec0de2b-bb16-4f6e-ba07-2aea25a43e76/protocol-2885.pdf>
- Kumar, S.; Stecher G.; Tamura K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molec. Biol. and Evolut.*, **33**, 1870-1874.
- Kwayess, R.; Al Hariri, H.E.; Hindy, J.R.; Youssef, N.; Haddad, S.F.; Kanj, S.S. (2022). *Burkholderia cepacia* infections at sites other than the respiratory tract: A large case series from a Tertiary Referral Hospital in Lebanon. *J. Epidemiol. and Global Health.*, **12**(3), 274-280.

- Lara-Oya, A. (2022). *Stenotrophomonas, Burkholderia* and other related microorganisms. *J. Encycloped. Infection and Immun.*, 656-661.
- Macfaddin, J.F. (2000). "Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria". 3rd ed. The Williams and Wilkins co. Baltimore. USA.
- Moehring, R.W.; Lewis, S.S.; Isaacs, P.J.; Schell, W.A.; Thomann, W.R.; Althaus, M.M. (2014). Outbreak of bacteremia due to *Burkholderia contaminans* linked to intravenous fentanyl from an institutional compounding pharmacy. *JAMA Internal Medicine.*, **174**(4), 606-612.
- Nagoba, B.S.; Pichare, A. (2016). "Microbiology and Parasitology PMFU-E-Book". Elsevier Health Sciences. New York, USA.
- Nguema, S.M.; Nguema, P.D.; Angone, S.A.; Rerambiah, L.K. (2021). Epidemiology of nosocomial bacteremia due to bacteria from the "*Burkholderia cepacia* complex" at Libreville University Hospital Center. *Advances in Microbiol.*, **11**(9), 417-427.
- Rastogi, N.; Khurana, S.; Veeraghavan, B.; Yesurajan Inbanathan, F.; Rajamani, S. (2019). Epidemiological investigation and successful management of a *Burkholderia cepacia* outbreak in a neurotrauma intensive care unit. *International J. Infectious Diseases: IJID: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases.*, **79**, 4-11. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.10.008>
- Sfeir, M.M. (2018). *Burkholderia cepacia* complex infections: More complex than the bacterium's name suggest. *J. Infection.*, **77**(3), 166-170. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2018.07.006>
- Shukla, R.; Bilolikar, A.K.; Udayasri, B.; Rani, P. (2018). Antibiotic susceptibility pattern of *Burkholderia cepacia* complex from various clinical samples in a tertiary care center: A one year prospective study. *J. Med. Sci. Res.*, **6**(1), 1-5.
- Sneath, P.H.A.; Sokal, R.R. (1973). "Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification". WF Freeman and Co., San Francisco, USA. 573 p.
- Wanger, A.; Chavez, V.; Huang, R.; Wahed, A.; Dasgupta, A.; Actor, J.K. (2017). "Microbiology and Molecular Diagnosis in Pathology: A Comprehensive Review for Board Preparation, Certification and Clinical practice". Elsevier, USA, pp. 75-117.
- Wisplinghoff, H. (2017). "*Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. and Miscellaneous Gram-negative Bacilli. In Infectious Diseases". Elsevier, USA. pp. 1579-1599

Phylogenetic Analysis of 16S rRNA Gene of *Burkholderia cepacia* Complex Species Isolated from Different Clinical Sources

Hazim M. Al Jarjary

Fayida Health care Center / Directorate of Health Nineveh/ Ministry of Health

Essra Gh. Alsammak

Department of Biology/ College of Science/ University of Mosul

ABSTRACT

Twenty hundred and fifty clinical samples were collected from different clinical sources for patients of both sexes for the period from October 2021 to May 2022. These samples were obtained from several hospitals in Mosul city (Al-Jumhuri Teaching Hospital, Al-Salam Teaching Hospital, Ibn Sina Teaching Hospital, Mosul specialized center for burns and surgery aesthetics and Fayda health center). Out of 250 samples, 47 samples showed no growth at a rate of 18.8%, while 203 samples at 81.2% showed bacterial growth on Maconkey agar medium. The diagnosis was confirmed by using Oxidation Fermentation Polymyxin Bacitracin Lactose Agar medium, 18 isolates were diagnosed as Bcc related and the percentage of isolates obtained reached 7.2% of the total diseased (250), which included 2.4% (6) of burns, 1.6% (4) of wounds, 1.2% (3) of urine,

1.2% (3) of diabetic foot ulcer and 0.8% (2) of sputum. Bcc isolates were characterized by the production of virulence factors, including urease enzyme, slime layer production, biofilm production, gelatinase enzyme production and hemolysin production. With percentages of (100%) 21, (100%) 21, (100%) 21 (100%), (66.7 %) 14 and (47.6%) 10, respectively. The sequencing of 16S rRNA genes were compared with the gene sequences of the references isolates in the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) within the NCBI database. A tree diagram was obtained in which the strains belonging to the Bcc group were distributed into five clusters A, B, C, D, and E at 97% similarity for cluster A, 97.4% similarity for cluster B, 97.8% similarity for cluster C, and at 97.6% similarity for cluster D, while cluster E included one isolate that was associated at 95% by using Mega 7 program and UPGMA method

The strains HE2 and HE14 were submitted to the GenBank under the accession numbers OP218010 and OP218012, respectively. It was found that these bacteria are resistant to many antibiotics, but they showed a kind of sensitivity to the antibiotic Meropenem. The multi-drug resistance of bacteria also corresponds to their possession of efflux pumps.

Keywords: Bcc, OFPBL, 16S rRNA, BLAST.