Journal
Goidi American Journal
of Innovation Development and Investment
GOIDI INTERNATIONAL GROUP OF INSTITUTION

GOIDI
GIOBAI UNIVERSAI INNOVATIONS.INC
DEVEIOPMENT . INVESTMENT
USA DELAWARE FILE 7621499

GOIDI American Journal
of Innovation, Development and Investment

مجلة دولية محكمة

Issued from USA

Global Universal Innovations Inc.
Development. Investment
Chairman

DR.IBRAHEM ALYASEN

Eigth ISSUE - vol 3

March 2022

www.goidi-usa.org

Scanned with CamScanner

ADMINISTRATIVE BOARD

DR. IBRAHIM ALYASEEN

PRESIDENT

of The American GOIDI Organization

CHAIRMAN

of The Board of Directors of GOIDI Journal

JORDAN

Prof.Dr.Walid Tawfik

Vice President for Scientific Affairs

Affiliation: •National Institute of Laser Enhanced Sciences, NILES.

Cairo University, Giza-Egypt.

Dr.Nebras Rada Mohammed

Managing Editor

PHD. Molecular genetics/ Genetic engineering/ Protein engineering

Masters / Molecular Biology / Microbiology

Nationality / Iraqi

Scanned with CamScanner

GOIDI AMERICAN JOURNAL
Journal
Goidi American Journal
of Innovation Development and Investment
GOIDI INTERNATIONAL GROUP OF INSTITUTION

Inventions

Patent

د. نبراس رضا محمد حسن

مكان العمل / كلية التراث الجامعة AL-Turath University college

E. Mail: nebrasrada5@gmail.com

أسم وعنوان الأختراع

الكشف عن مقاومة مضاد الكولستين Colistin والبوليميكسين PolymyxinB B في بكتريا (PDR) *Pseudomonas aeruginosa* وتحديد سبب المقاومة وتحديد نوع الطفرة.

The detection for resistance Colistin and Polymyxin B antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* (PDR) and determine the cause of the resistance with determine type of mutation.

السيرة الذاتية للمخترعة:

دكتورة نبراس رضا محمد / دكتوراه تقنيات احيانية / وراثة جزينية/ هندسة وراثية-هندسة بروتينات/ باحثة 50 بحث/ مخترعة 4 براءات اختراع مقبولة و5 مسجلة / حاصلة على 80 وسام ذهبي ووسام مشروع عالم / مبدعة من مجلس النواب العراقي ومن الاردن, تونس, ماليزيا, الجزائر, سوريا/ مؤلفة ل 8 مؤلفات علمية/ تدريسية في مجموعة طبية التخدير والعناية المركزة/ بروفيسور فخري/ مستشار في المختبرات الطبية/ خبير في المختبرات الطبية/ حاصلة على ستة (6) جوائز من كندا- تورنتو

Scanned with CamScanner

GOIDI AMERICAN JOURNAL
Journal
Goidi American Journal
of Innovation Development and Investment
GOIDI INTERNATIONAL GROUP OF INSTITUTION

وامريكا ومصر / جائزة افضل شخصية وجائزة الملكية الفكرية العالمية WIPO وجائزة أفضل أمرأة عربية 2020 وجائزة جويدي الامريكية وجائزة افضل بحث 2019 وجائزة افضل بحث 2020 وفي المركز الاولى عالميا للمخترعين.

الملخص

الكشف عن مقاومة مضاد الكولستين Colistin والبوليميكسين B PolymyxinB في بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* (PDR) وتحديد سبب المقاومة وتحديد نوع الطفرة بدراسة جين *exoS* وجين *exoU* المشفر للانزيم الخارجي Exoenzyme S والانزيم الخارجي Exoenzyme U وجين *toxA* المشفر للسم الخارجي ExotoxinA المسؤول عن مقاومة مضاد الكولستين Colistin والبوليميكسين PolymyxinB في بكتريا (PDR) *Pseudomonas aeruginosa* وتحديد نوع الطفرة الحاصلة في الجينات *exoS*, *exoU* و *toxA* .

جمعت 66 عزلة تعود لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa*(PDR) من مصادر سريرية مختلفة شملت 20عزلة من الحروق ,10 عزلة من القشع ,13 عزلة من الجروح ,10 عزلة من الدم ,4 عزلة من التليف الكيسي ,4 عزلة من التهاب المجاري البولية (UTI) ,3عزلات من الاذن و 2عزلة من غسل القصبات Bronchial wash.

أختبرت حساسية العزلات تجاه مضادات عديدة شملت 21 مضاد حيوي وهي :

Ciprofloxacin , Tetracycline, Gentamycin , Polymyxin ,Colistin , Lomefloxacin , Nalidixic acid , Tobramycin , Carbenicillin , Aztreonam , Cefepime , Cefoxitin , Ceftazidime , Amoxcillin , Levofloxacin , Ofloxacin Azithromycin, Chloramphenicol , Ceftriaxone ,Pipracillin

Amoxicillin+Clavulanic acid والاهم مضاد الكولستين(بوليمكسين E)والبوليمكسين B بأستعمال طريقة فحص حساسية المضادات الحيوية وأظهرت النتائج وجود 46 عزلة مقاومة للكولستين والبوليميكسين B ,أن جميع عزلات *P.aeruginosa* مقاومة للمضادات التابعة للأصناف التالية -B lactam, Aminoglycosides و Flouroquinolones والنتائج توضح ان مقاومة بكتريا

Scanned with CamScanner

P.aeruginosa تابعة للنوع Pan Drug Resistance (PDR) وانها مقاومة لجميع الاصناف ولاتمتلك حساسية لاي مضاد حيوي وذات مقاومة عالية جدا.

تمت دراسة MIC(Minimum Inhibitory Concentration) الحد الأدنى لتركيز مضاد الكولستين الباودر , ثم أخذ العزلات المقاومة للكولستين والحساسة للكولستين للكشف الجيني بطريقة Genotypic Conventional PCR.

أخضعت 66عزلة (46) مقاومة للكولستين و 20 عزلة حساسة للكولستين للكشف الجيني بأستعمال تقنية Conventional PCR للتحري عن الجين *exoS* المشفر للأنزيم الخارجي Exoenzyme S والتحري عن جين *exoU* المشفر للانزيم الخارجي Exoenzyme U والكشف الجزيني *toxA* المشفر للسم الخارجي ExotoxinA بدراسة الجين , نتائج جميع العزلات (PDR) *P.aeruginosa* (46)عزلة مقاومة للكولستين والبوليمكسين B أمتلاكها للجين *exoS* ذو حجم (504bp) المشفر للانزيم الخارجي Exoenzyme S وأمتلاكها الجين *exoU* المشفر للانزيم الخارجي Exoenzyme U (428, 752bp) وجين *toxA* (352bp) المشفر للسم الخارجي Exotoxine A, وان العزلات الحساسة للكولستين لاتمتلك الجينات *exoS*, *exoU*, *toxA* ذلك أثبات أن سبب مقاومة مجموعة البوليمكسينات التي تشمل الكولستين والبوليمكسين B في بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* (PDR) هو جين *exoS*, *exoU*, *toxA*.

تم الكشف عن التعبير الجيني للانزيم الخارجي Exoenzyme S بدراسة الجين *exoS* الذي يمثل الوحدة B-subunit المسؤولة عن فعالية الانزيم في حدوث الاصابة ودراسة الجين*exoU* المشفر للانزيم الخارجي المسؤول عن الوحدة السمية cytotoxic subunit وجين *toxA* المشفرللسم الخارجي Exotoxin A في 9 من العزلات المقاومة للكولستين (البوليمكسين E) والبوليمكسين B بأستعمال تقنية qRT-PCR وبعد أضافة مسحوق الكولستين لأنابيب الاختبار الحاوية على الوسط السائل , تم حضن البكتريا لمدة 18ساعة للوصول الى الطور اللوغارتمي ,ثم أستخلاص RNA من البكتريا المقاومة للكولستين والبوليميكسين B ,وتحويله الى cDNA داخل جهاز Thermal cycler . أثبتت النتائج أن عزلات بكتريا (PDR) *P. aeruginosa* المقاومة للكولستين والبوليميكسين B عند اضافة مسحوق الكولستين والبوليميكسين B بتركيز (1, 2 mg/L) تمتلك تعبير جيني عالي جدا للانزيم الخارجي Exoenzyme S المشفر من قبل الجين *exoS* والانزيم الخارجي Exoenzyme المشفر من

Scanned with CamScanner

قبل الجين *toxA* في (PDR)*P.aeruginosa* المقاومة للكولستين والبوليميكسين B , اما العزلات الحساسة للكولستين والبوليميكسين B (9)عزلة غير المقاومة للكولستين والبوليميكسين B لم تظهر أي تعبير جيني عند اضافة مسحوق الكولستين والبوليميكسين B ومن النتائج اعلاه اثبات ان المسؤول عن مقاومة مضاد الكولستين والبوليميكسين B هو *exoS, exoU* المشفر للانزيم الخارجي ExoenzymeS ExoenzymeU والجين *toxA* المشفر للسم الخارجي Exotoxin A .

تمت دراسة تسلسل DNA (DNA Sequencing) بأستخدام برنامج Pairwise alignment and Tamura-Neigenetic destine model (UPGMA) Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean للجينات *exoS* , *exoU* و *toxA* أثبت انه هناك طفرات في جميع هذه الجينات *exoS* , *exoU* , وجين *toxA* , وان الطفرات الحاصلة في الجين *exoS* طفرات نقطية Point mutation من نوع transition و transversion في القاعدة النتروجينية NO.17 في الثمالة 52 تحول من ثايمين (T)الى ادنين (A)ادت الى تغير في الحامض الاميني ليوسين (Leu) الى كلوتامين (Gln), كذلك طفرة من نوع transition للجين *exoS* في القاعدة النتروجينية NO.18 للثمالة 55 تحول كوانين (G) الى ادنين (A) ادت الى تحول الحامض الاميني من سيرين (Ser) الى اسبارجين (Asn).

اما الطفرات الحاصلة في الجين *exoU* كثيرة في عينات مختلفة بعض منها طفرة انغراز Insertion في الموقع 571+ من نوع transition , transversion ادت الى تكوين شفرة ايقاف stop codon واخرى طفرة من نوع الاستبدال substitutions , كذلك حصول طفرة في الموقع 564+ انغراز قاعدة نتروجينية سايتوسين (C), واخرى من نوع missense mutation في الموقع 557+ والموقع 558+ وكذلك حصول طفرة من نوع Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) في الموقع 111+ طفرة من نوع Silent mutation , وطفرة اخرى من نوع طفرة انغراز insertion اي انغراز سايتوسين (C) في الموقع 564+ ادت الى تغير في قراءة القواعد النتروجينية Frame shift mutation واخرى في الموقع 560+ والموقع 561+ , ايضا حصول طفرة من نوع Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) في الموقع 572(T/C)+ والموقع 601 (G/C)+ ادت الى Silent mutation, كذلك حصول طفرتين في الموقع 74(G/C)+ والموقع 398(A/G)+ ,

Scanned with CamScanner

وطفرة اخرى في عزلات الجروح من نوع انغراز في الموقع 14+ والموقع 16+ وثلاث طفرات من نوع Missense mutation في الموقع 186+ و235+ والموقع 403+ .

اما الطفرات الحاصلة في الجين *toxA* هي طفرات نقطية Point mutation في القاعدة النتروجينية no.36 في الثمالة 12 ادت الى تحول من كوانين (G) الى ادنين (A) ادت الى تحول الحامض الاميني من ارجنين (Arg) الى هستدين (His), كذلك حصول طفرة في نفس الجين في القاعدة النتروجينية no.134 لثمالة الحامض الاميني 44 سببت تحول من كوانين (G)الى ادنين (A) ادت الى تغير في الحامض الاميني من ثريونين (Thr) الى النين(Ala) , وطفرة اخرى نقطية في القاعدة النتروجينية no.132 في الثمالة 44 سببت تحول من ادنين (A) الى كوانين (G)ادت الى تغير في الحامض الاميني من ثريونين (Thr) الى النين (Ala), وطفرة نقطية اخرى في القاعدة النتروجينية no.233 في الثمالة 78 تحول من ادنين (A) الى كوانين (G) والتي ادت الى تغير في الحامض الاميني من اسبارجين (Asn) الى سيرين (Ser), وكذلك حصول طفرة نقطية اخرى في القاعدة النتروجينية no.36 في ثمالة الحامض الاميني 12 ادت الى تحول من كوانين (G) الى ادنين (A) والتي سببت تغير في الحامض الاميني من الارجنين (Arg) الى هستدين (His).

Abstract

The detection for resistance Colistin and Polymyxin B antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* (PDR) and determine the cause of the resistance with determine type of mutation. *exoS* , *exoU* gene encoded for Exoenzyme S,Exoenzyme U and *toxA* gene encoded for Exotoxin A responsible for resistance Colistin and Polymyxin B antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* (PDR) and determine type of mutation.

Sixty-six isolate of *Pseudomonas aeruginosa* (PDR) were collected from different clinical sources including 20 isolates from burns, 10 isolates from Sputum, 13 isolates from wounds, 10 isolates from blood, 4 isolates from cystic

Scanned with CamScanner

fibrosis, 4 isolates from UTI, 3 isolates from ear and 2 isolates from Bronchial wash.

Antimicrobial sensitivity was tested against several antibiotics (21) antibiotics including PolymyxinB (PB), Colistin (CT), Tetracycline (TE), Gentamycin (CN) Carbenicillin (PY), Aztreonam (ATM), Ciprofloxacin (CIP) Norfloxacin (NOR), Nalidixic acid (CN), Tobramycin (TOB) Levofloxacin (LEV), Ofloxacin (OFX), Lomefloxacin (LOM), Amoxcillin (AX), Amoxcillin + Clavulunicacid (AMC), Ceftazidime (CAZ) Ceftriaxone (CRO), Pipracillin (PRL), Cefepime (FEP),Cefoxitin (Fox), Chloramphenicol (C), Azithromycin (AZM). The results showed all isolates of *P.aeruginosa* resistant to all antibiotics, some of antibiotics belong to the B-lactam, Aminoglycosides and Flouroquinolones,this resistance include type of (PDR) Pan Drug Resistance. All isolates resistance to all antibiotics and no sensitive to any antibiotic, this isolates high resistance to antibiotics and very dangerous.

Minimal Inhibitory Concentration (MIC) was performed to determine the minimize of antibiotics and determine colistin-resistant isolates and colistin-sensitive isolates, the genotypic detection done of *exoS*, *exoU* and *toxA* gene by using Conventional PCR.

Sixty-six isolates collected from different clinical sample included 46 isolates resistant to colistin, Polymyxin B and 20 isolates sensitive to colistin and Polymyxin B were done genotypic detection by Conventional PCR for *exoS*, *exoU*, and *toxA* gene encoded for exoenzyme S, exoenzyme U and exotoxin A. The results showed all isolates of *P.aeruginosa* (PDR) resistance for colistin (polymyxin E) and polymyxin B posses *exoS* gene (504pb), *exoU* gene

Scanned with CamScanner

(428bp,752bps) and *toxA* gene (352bp) while the non-colistin resistance , Polymyxin B isolates not possess *exoS*, *exoU*, and *toxA* genes.

Exoenzyme encoded by *exoS*, the B-subunit responsible for the enzyme's effectiveness and *exoU* is cytotoxic subunit resbonsible for toxicity of host tissue was studied and the exotoxin encoded by *toxA* gene also studied in 9 isolates resistance for Colistin, polymyxins B by using qRT-PCR (quantitative Real Time PCR) technique after adding (1, 2 mg/l) colistin and Polymyxin B powder to test tubes containing the bacterial growth in liquid medium incubated in 18 hours to reach the logarithmic phase, then extract the RNA from *P.aeruginosa* (PDR) resistant Colistin, Polymyxin B and converting it into cDNA in the thermal cycler machine, the results showed that isolates when adding 1, 2 mg /L of Colistin powder possess a high gene expression of Exoenzyme S, Exoenzyme U and Exotoxin A encoded by *exoS* ,*exoU* and *toxA* gene. It indicates the isolates of *P.aeruginosa* (PDR) resistant to colistin and polymyxin B have a very high expression of ExoenzymeS, ExoenzymeU and Exotoxin A when studying *exoS*, *exoU* and *toxA* but *P.aeruginosa* sensitive colistin not possess gene expression of Exoenzyme S ,Exoenzyme U and Exotoxin A when adding the colistin powder and Polymyxin powder.

Determine types of mutation by study DNA sequencing of *exoS*, *exoU* and *toxA* gene with Pairwise alignment and Tamura-Neigenetic model (UPGMA) Unweighted Pair Group Method with Arithmetic, the results showed there are point mutation transversion and transition of *exoS* gene in no.17 base pair in 52 residue that convert nitrogen base from thiamine (T) into adenine (A) that cause change in amino acid from leucine (Leu) into glutamine(Gln) , also found transition mutation to *exoS* gene in no.18 base pair in 55 residue leading to

Scanned with CamScanner

conversion from guanine (G) into adenine (A) that cause conversion in amino acid from serine (Ser) to aspargine (Asn).

The mutation occurs in *exoU* gene determined by DNA sequencing from several samples, there are point mutation by insertion nucleotide in +571 leading to transition and transversion leading to causes stop codon and cause substituations mutation , other mutation cause mutation in +564 by insert cytosine(C) base pair that cause missense mutation in +557, +558 and single nucleotide polymorphisms (SNPs) in +111(T/C) that cause Silent mutation and occurs mutation by insertion cytosine (C) in +564 that cause changing reading frameshift mutation, also others mutation cause missense mutation in +560 and +561, cause mutation SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) in +572(T/C) and +601(G/C) that cause silent mutation, two mutation occurs in +74(G/C) and +398 (A/G), others mutations occurs in wound infections by insertion in +14,+16, 3 mutations and occurs missense mutation in +186, +235, +403. The point mutations occurs in *toxA* gene in no.36 base pair in 12residue leading to conversion from guanine (G) into adenine(A) that cause changing amino acid from arginine (Arg) into histidine (His) ,also cause mutation in *toxA* gene in no.134 in 44 residue leading to conversion from guanine (G) into adenine (A) that cause changing in amino acid from therionine(Thr) into alanine(Ala), also occurs point mutation in *toxA* gene in no.132 in 44 residue leading to conversion from adenine (A) into guanine (G) that cause that leading to changing in amino acids from therionine (Thr) into alanine (Ala), also occurs point mutation to the same isolates leading to conversion of nitrogen base from adenine (A) into guanine (G) in no.233 in 78 residue cause changing of amino acid from aspargine (Asn) into serine(Ser) , others point mutations occurs in

Scanned with CamScanner