وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

الكشف عن جينات نظام الافراز الثالث في بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من مصادر سريرية في محافظة ديالى

رسالة مقدمة الى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير

في علوم الحياة

من قبل الطالبة

ايناس عمار محمد الجبوري

بكالوريوس علوم الحياة 2015-2016/ جامعة ديالى

بأشراف

أ.د. عباس عبود فرحان الدليمي   **أ.م.د. علي جعفر سليم**

1442 هـ   **2021 م**

1.المقدمة Introduction

تعد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* سبب رئيس لعدوى المستشفيات ، و هي تصنف ثاني اكثر المسببات المرضية المعزولة من المرضى من بين المسببات المرضية السالبة لصبغة كرام التي تم الابلاغ عنها من قبل النظام National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) (Shenoy و آخرون , 2014) ، يمكن ان تسبب هذه البكتريا مجموعة واسعة من الامراض المعدية الحادة و المزمنة. و المواقع الرئيسة للعدوى هي الجهاز التنفسي Respiratory Tract ، المسالك البولية Urinary Tract ، الحروق Burns ، الجهاز الهضمي Digestive ، عدوى الأذن Ear Infections ، و الجروح Wounds . يمكن ان تصل بكتريا *P.aeruginosa* الى مجرى الدم من خلال هذه المواقع ، مما يؤدي الى عدوى جهازية تسمى تجرثم الدم Bacteremia (Migiyama و آخرون , 2016) ، و اعراض هذه العدوى هي التهاب عام و انتان Sepsis خاصة في مرضى الحروق إذ يتم تدمير جلد العائل و المرضى الذين يعانون من ضعف الجهاز المناعي بما في ذلك المصابين بفايروس نقص المناعة البشرية HIV أو مرضى السرطان الذين يعانون كبت المناعة Immunosupperssed (Rostamzadeh و آخرون , 2016). بكتريا *P.aeruginosa* ثاني اكثر الاسباب شيوعاً للالتهاب الرئوي Nosocomial Pneumonia في المستشفيات ، و السبب الثالث الاكثر شيوعاً لعدوى المسالك البولية في المستشفيات ، و السبب السابع الاكثر شيوعاً لتجرثم الدم (Fazeli و , 2014) Momtaz.

تعرف المقاومة الدوائية المتعددة Multidrug Resistant (MDR) لبكتريا *P.aeruginosa* بقدرتها على مقاومة ثلاثة انواع على الاقل من مضادات الحياة تابعة الى ثلاث مجاميع مختلفة من بين البيتالاكتام β-Lactams ، و الامينوكلايكوسيدات Aminoglycosides ، و الفلوروكينولينات Fluoroquinolones و الكاربابينيم Carbapenems ، و تعزى ظاهرة المقاومة الدوائية المتعددة لبكتريا *P.aeruginosa* الى امتلاكها عدة مجاميع من انظمة الدفق و انتاج انزيمات البيتالاكتام β-Lactamase و النفاذية المحدودة للغشاء الخارجي (Mohamad و آخرون , 2017). إذ تمثل بكتريا *P.aeruginosa* احدى انواع البكتريا السالبة لصبغة كرام المسببة للامراض و ذلك لامتلاكها العديد من عوامل الضراوة التي لها اثراً في امراضيتها و منها الاسواط Flagellum ، الاهلاب Pili IV ، و انزيم Exoenzym S التي تساعدها على

الالتصاق (Neamah , 2017) ، و الانزيم المحلل للدم Hemolysine ، و الانزيم المحلل للدهون الفوسفاتية Phospholipase ، و الانزيم المحلل للبروتين Protease و انزيم Elastase (Ochoa و آخرون , 2013) ، بالإضافة الى الذيفانات المتمثلة بـ Exotoxin A ، و Endotoxin المسؤول عن الحمى Fever و الصدمة Shock المرتبطة بتسمم الدم Sepsis مع انتاج الصبغات مثل صبغة البايوفردين Pyoverdin و البايوسيانين Pyocyanin (Sudhakar و آخرون , 2015) ، اضافة الى امتلاكها طبقة الالجنيت Alginate و الغشاء الحيوي Biofilm الذي يزيد من مقاومتها للمضادات الحيوية (Alhazmi , 2015).

تميل بكتريا *P.aeruginosa* الى تكوين الاغشية الحيوية ، و هي عبارة عن مجتمعات بكتيرية معقدة تلتصق بمجموعة متنوعة من الاسطح ، بما في ذلك المعادن و البلاستيك. يعزز النمو في الاغشية الحيوية بقاء البكتريا ، بمجرد تكوين الاغشية الحيوية يكون من الصعب تدميرها (Dlugaszewka و آخرون ,2016) ، و هي ميزة انتقائية تسهل بقائها على قيد الحياة وتتكون الاغشية الحيوية من الخلايا العائمة الفردية (العوالق) ويتم تعريفها على انها البكتريا المحيطة بالسكريات الخارجية او البكتريا الدقيقة التي تنمو على الاسطح الحيوية او غير الحيوية . الاغشية الحيوية منتشرة في كل مكان و ترتبط ايضاً بالعديد من الامراض البكتيرية المزمنة المتكررة و الامراض (Heydari و Eftekhar , 2015).

نظام الافراز من النوع الثالث لبكتريا *P.aeruginosa* و العوامل التي يتم افرازها من خلال T3SS ، بما في ذلك Monomeric flagellin (Huus و آخرون , 2016). يعتبر نظام الافراز النوع الثالث T3SS احد عوامل الضراوة المهمة و التي توجد في نطاق واسع من مسببات الامراض و خاصة العصيات السالبة لصبغة كرام ، بما في ذلك *P.aeruginosa* ، *Shigella* Spp. ، *Salmonella* spp. ، *Yersinia* spp. . نظام الافراز الثالث T3SS عبارة عن آلة نانوية مزدوجة الغشاء في بكتريا Pseudomonas تعزز نقل البروتينات الفعالة البكتيرية إلى السيتوبلازم أو غشاء البلازما للخلايا حقيقية النواة المستهدفة ، وبالتالي تعزيز الغزو البكتيري Bacterial invasion والاستعمار Colonization (Costa و آخرون , 2016).

يفرز عدد من السموم الخارجية في سايتوبلازم الخلية المضيفة عبر T3SS بواسطة التلامس الخلوي (Adwan , 2017) ، و قد تم تحديد السموم المفرزة (بروتينات المستجيب) و هي اربعة

بروتينات او سموم مستمدة تنتمي الى T3SS ، بما في ذلك انزيمات Exoenzym S (ExoS) ، Exoenzym T (ExoT) ، Exoenzym U (ExoU) ، و Exoenzym Y (ExoY) (Azimiو آخرون , 2016). يتم التعبير عن هذه البروتينات في بكتريا *P.aeruginosa* بشكل متفاوت في سلالات و عزلات مختلفة و لها انشطة مختلفة. دور T3SS في الإمراضية غير واضح تمامًا ، ولكن يُعتقد أن T3SS قد يسمح لبكتريا *P.aeruginosa* باستغلال الثغرات في الخلايا الظهارية عن طريق منع التئام الجروح أثناء الاستعمار و تعزيز إصابة الخلايا مما يؤدي إلى أعراض الالتهاب الرئوي الجرثومي pneumonia (Gellatly و Hancock , 2013).

البروتين ExoS وزنه الجزيئي 49KD يعمل على موت الخلايا المبرمج والنخر وقتل خلايا المضيف المناعية واضطراب الهيكل الخلوي وتثبيط تخليق الحمض النووي. ExoT هو بروتين وزنه الجزيئي 53KD يعمل على موت الخلايا المبرمج ، تغيير الهيكل الخلوي للاكتين ، منع البلعمة ، و منع هجرة الخلايا . يعمل Exo U نخر و قتل الخلايا البلعمية و كذلك الحواجز الظهارية ، يبلغ وزنه الجزيئي 74KD. أما البروتين ExoY يعمل على اضطراب الهيكل الخلوي للأكتين وزيادة نفاذية البطانة ، وزنه الجزيئي 41KD (Harper و آخرون , 2014).

الهدف من الدراسة :-

1- عزل و تشخيص بكتريا *P.aeruginosa* من عينات سريرية مختلفة في محافظة ديالى.

2- التحري عن بعض عوامل الضراوة في عزلات بكتريا *P.aeruginosa* .

3- دراسة مقاومة عزلات بكتريا *P.aeruginosa* لبعض مضادات الحياة.

4- الكشف عن وجود جينات نظام الافراز الثالث لبكتريا *P.aeruginosa* بواسطة تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR .

5- التحليل التتابعي Sequencing للجين التشخيصي *rps L* في بكتريا *P.aeruginosa* .

الخلاصة

تم جمع (250) عينة سريرية من اخماج الحروق و الجروح و اخماج المسالك البولية ، التهاب الاذن الوسطى و الدم و اللوزتين من المرضى الراقدين و المراجعين في مستشفى بعقوبة التعليمي و العيادة الاستشارية في محافظة ديالى ، خلال الفترة من 2019/11/23 الى 2020/1/20.

اظهر الكشف باستخدام الطرق التقليدية و الفحوصات الكيموحيوية و الكشف الجزيئي باستخدام جين *rps L* ان 43 (17.2%) من العزلات كانت من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* .

اعطت جميع العزلات نتائج ايجابية لكل من اختبار الاوكسيديز و الكاتاليز ، اظهرت نتائج اختبارات عوامل الضراوة ان جميع العزلات كانت منتجة لكل من انزيم الهيمولايسين ، انزيم البروتييز المحلل للبروتين ، انزيم اللايبييز المحلل للدهون ، الغشاء الحيوي ، الكبسولة ، و الالتصاق بالخلايا الطلائية بنسبة 100% ، في حين كانت نسبة 88.37% من العزلات منتجة لإنزيم اليوريز ، و 65011% من العزلات كانت منتجة لصبغة البايوسيانين.

اجري اختبار الحساسية باستخدام ثمانية انواع من المضادات تم التحقق من مقاومة وحساسية عزلات بكتريا *P. aeruginosa* بوساطة طريقة انتشار الاقراص القياسية (كيربي باور). بلغت نسبة المقاومة 88.37% لمضاد Ceftazidime ، 53.48% لمضاد Cefepime ، 34.88% لمضاد Ciprofloxacin ، 44.18% لمضاد Piperacillin ، 25.58% لمضاد Amikacin ، 20.93% لمضاد Tobramycin ، 30.23% لمضاد Imipenem ، و 20.93% لمضاد Polymxin B.

أظهر اختبار حساسية المضادات الحيوية لعزلات بكتريا *P. aeruginosa* أن 20 عزلة (46.51%) كانت حساسة لمضادات متعددة (MDS) و 22 عزلة (51.16%) متعددة المقاومة (MDR) و عزلة واحدة كانت شديدة المقاومة للمضادات الحيوية (XDR).

تم استخلاص الحامض النووي DNA لـ 16عزلة من بكتريا *P.aeruginosa* بواسطة عدة الاستخلاص وتم قياس التركيز لنماذج الحامض النووي بواسطة جهاز مقياس التألق الكمي Quantus Fluorometer و كان التركيز يتراوح من (16-5 ng/µl).

استخدمت تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل للكشف عن جين عامل الضراوة *Exo A* و نظام الافراز الثالث للحامض النووي DNA المستخلص من 16عزلة من بكتريا *P.aeruginosa* .

أظهرت النتائج أن 15 (93.75%) كانت تمتلك جين عامل الضراوة *exo A* . كذلك أظهرت نتائج الدراسة أن جين *exoS* يوجد في 11 عزلة (68.75٪) ، يوجد جين *exo T* في جميع العزلات (100%) ، اما جين *exo U* كان يوجد في 6 عزلات (37.5%) ، بينما جين *exoY* وجد في 15عزلة (93.75%).

تم التحليل التتابعي DNA Sequencing للجين *rps L* واظهرت النتائج وجود عدة طفرات المتمثلة بطفرات الانتقال Transition mutation وطفرات الاستبدال Substitution mutation و التي ادت الى تغيير بالأحماض الامينية.