



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

## دراسة جزيئية لجينات Quorum Sensing في بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من المرضى

رسالة مقدمة

الى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى وهي جزء من متطلبات نيل  
درجة الماجستير في علوم الحياة

من الطالبة

سهى حميد محمود

بكالوريوس علوم الحياة 2012-2013 / جامعة ديالى

بإشراف

أ.م.د. علي جعفر سليم

2022 م

1442 هـ

## 1. المقدمة Introduction

تعد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* سبباً رئيسياً لعدوى المستشفيات ، فهي تعد ثاني أكثر المسببات المرضية المعزولة من المرضى من بين المسببات المرضية السالبة لصبغة كرام التي تم الإعلان عنها من قبل النظام (NNIS) National Nosocomial Infections Surveillance (Azam و Khan ، 2019) ، إنّ هذه البكتريا يمكن ان تسبب مجموعة واسعة من الأمراض المعدية المزمنة Chronic والحادة acute . و ان المواقع الرئيسية للعدوى هي الجهاز التنفسي Respiratory system ، المسالك البولية Urinary Tract ، الحروق Burns ، الجهاز الهضمي Digestive ، الأذن Ears ، و الجروح Wounds . إنّ بكتريا *P.aeruginosa* يمكن أن تصل الى مجرى الدم عن طريق هذه المواقع ، مما يؤدي إلى عدوى جهازية تدعى تجرثم الدم (Migiyama) Bacteremia و آخرون ، 2016) ، ومن أعراض هذه العدوى هي إلتهاب عام و إنتان Sepsis خاصة في مرضى الحروق إذ يتم تدمير جلد العائل و المرضى الذين يعانون من ضعف في الجهاز المناعي بما في ذلك المرضى المصابين بفيروس نقص المناعة البشرية HIV أو مرضى السرطان الذين يعانون كبت المناعة Immunosuppressed ( Rostamzadeh و آخرون ، 2016) . تعدّ بكتريا *P.aeruginosa* ثاني أكثر الأسباب شيوعاً للإلتهاب الرئوي في المستشفيات ، و السبب الثالث الأكثر شيوعاً لعدوى المسالك البولية في المستشفيات ، و السبب السابع الأكثر شيوعاً لتجرثم الدم (Fazeli و Momtaz ، 2014).

تمتاز بكتريا *P.aeruginosa* بامتلاكها مقاومة متعددة للمضادات الحيوية Multidrug Resistant (MDR) إذ إنها تستطيع ان تقاوم 3-7 مجاميع من المضادات الحيوية ، و يرجع سبب ظاهرة المقاومة الدوائية المتعددة لبكتريا *P.aeruginosa* الى إنها تمتلك عدة مجاميع من أنظمة الدفاع والقدرة على انتاج إنزيمات البيتا لكتام  $\beta$ -Lactamase و النفاذية المحدودة للغشاء الخارجي (Mohamad و آخرون ، 2017).

تمتاز هذه البكتريا بامتلاكها العديد من عوامل الضراوة التي يكون لها أثراً في إمرضيتها و منها الأهداب Pili IV و الأسواط Flagellum ، و إنزيم Exoenzym S التي تساعدها على الالتصاق (Neamah ، 2017) . و الإنزيم المحلل للبروتين Protease ، و الإنزيم المحلل للدهون الفوسفاتية Phospholipase ، و الإنزيم المحلل للدم Hemolysine ، و إنزيم 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 إنتاج الصبغات مثل صبغة البايوفردين Pyoverdin و البايوسيانين Pyocyanin (Sudhakar و آخرون ، 2015) ، إضافة إلى إمتلاكها طبقة الألجنيت Alginate و الغشاء الحيوي Biofilm الذي يزيد من مقاومتها للمضادات الحيوية (Alhazmi ، 2015) .

بكتريا *P.aeruginosa* تميل الى تكوين الأغشية الحيوية ، و هي عبارة عن مجتمعات بكتيرية معقدة تعمل على الالتصاق بمجموعة متنوعة من الأسطح ، بما في ذلك البلاستيك والمعادن. إن النمو في الأغشية الحيوية يعمل على تعزيز بقاء البكتريا ، إذ بمجرد تكوين الأغشية الحيوية يكون من الصعب تدميرها (Dlugaszewka و آخرون ، 2016) .

تتواصل البكتريا فيما بينها عن طريق نظام إستشعار النصاب Quorum Sensing (QS) لتنسيق وتنظيم التعبير الجيني ونشاطات الخلايا في داخل المجتمعات البكتيرية عن طريق إطلاق إشارات كيميائية تدعى بالمحفزات الذاتية Autoinducer(AI) ، ولقد تمّ إكتشاف ثلاثة أنواع من هذه الجزيئات وهي أسيل هوموسيرين لاكتون Acyl- Homoserine Lactone ( AHL) وجزيئات المحفزات الببتيدية القصيرة Oligopeptide-AIP وجزيئات Autoinducer-2 (AI-2) (Rai و آخرون ، 2015). وعندما يصل تركيز هذه الجزيئات خارج الخلية إلى الحد الحرج يتم التحسس من قبل البكتريا وذلك بالاعتماد على الكثافة العددية للبكتريا إذ كلما زادت الكثافة العددية للبكتريا، زادت معها قوة التواصل بين الخلايا لإنتاج هذه الجزيئات

لكي يتم تنسيق عمل المجتمع البكتيري بأكمله حتى يتصرف مثل الكائن الحي متعدد الخلايا في تنظيم العديد من السلوكيات التعاونية المرتبطة بأمراضية وضرارة البكتيريا كأنتاج عوامل الضرارة المهمة للاستعمار البكتيري (Yong و آخرون ، 2015 ; Papenfort و Bassler ، 2016 ، Moradali و آخرون ، 2017 ).

إنّ التطور الكبير في علم الأحياء الجزيئي أدى الى استعمال العديد من التقنيات الحديثة والمتطورة والسريعة في مجال إيجاد العلاقات الوراثية بين العزلات البكتيرية وتحديد مصدر وطرائق العدوى في داخل المستشفيات لمنع حدوث ما يسمى بالإصابات المكتسبة في المستشفيات (Ranjbar و آخرون ، 2014)، وبناء على ذلك يتم تقييم مدى فعالية الطرائق المتبعة في السيطرة على الممرضات لمنع العدوى وكذلك لتحديد مدى وبائيتها (Li و آخرون ، 2009) و هناك العديد من طرائق التتميط الجيني Genotyping التي لها اهمية كبيرة في هذا المجال واحدى هذه الطرائق هي طريقة التسلسلات المتكررة المعتمدة على جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل PCR - Repetitive sequence التي تعتمد على وجود تسلسلات متكررة في جينوم البكتيريا ومن انواعها طريقة التعداد التكراري للجراثيم المعوية ( Enterobacterial Repetitive ERIC Intergenic Consensus ) (Mohapatra و Mazumder ، 2008)، وتعد من الطرائق المهمة ، البسيطة والسهلة من ناحية اجرائها و اقل تعقيدا في تحليل النتائج من الطرائق الاخرى و أستعملت بشكل واسع في مجال دراسة التتميط الجيني Genotyping للعديد من الأنواع البكتيرية وفي مجال الدراسات الوبائية (EL Bialy - و آخرون ، 2008) .

فقد هدفت الدراسة إلى ما يأتي:

- 1- عزل و تشخيص بكتريا *P.aeruginosa* من عينات سريرية مختلفة في محافظة ديالى.
- 2- التحري عن بعض عوامل الضرارة في عزلات بكتريا *P.aeruginosa* .
- 3- دراسة مقاومة عزلات بكتريا *P.aeruginosa* لبعض مضادات الحياة.

## الخلاصة :

تركزت الدراسة الحالية على جينات استشعار النصاب Quorum sensing وذلك لأهميتها في انتاج عوامل الضراوة Virulence factors للبكتريا إذ ان هذه الجينات تسيطر على معظم عوامل الضراوة. تم جمع (380) عينة سريرية من أخماج الجروح والحروق و أخماج المسالك البولية والدم والتهاب الأذن الوسطى والحنجرة والتهاب المهبل من المرضى الراقدين و المراجعين في مستشفى بعقوبة التعليمي و العيادة الاستشارية في محافظة ديالى ، خلال الفترة من 2020/9/27 و لغاية 2021/1/10 .

زرعت العينات على وسط الماكونكي أكار و وسط أكار الدم و وسط أكار السيدوموناس الأساس وتمّ ملاحظة الصفات المظهرية للمستعمرات ، وتم إجراء الفحوصات المجهرية والكيموحيوية القياسية لتشخيص العزلات الجرثومية ، إذ تضمنت فحص الاوكسيديز والكتاليز و إختبارات IMViC ، كما تضمنت الدراسة التشخيص الجزيئي لعزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) Polymerase Chain Reaction إذ أظهر الكشف بإستخدام الطرق التقليدية و الكشف الجزيئي باستخدام جين *rpsL* ان 58 (15.2 %) من العزلات كانت من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* .

أظهرت نتائج إختبارات عوامل الضراوة ان العزلات قيد الدراسة الحالية كانت منتجة لكل من انزيم الهيموليسين Hemolysine، انزيم البروتيز Protease المحلل للبروتين ، الغشاء الحيوي Biofilm، الكبسولة Capsule بنسبة 100%، اما نسبة انتاجها للأشارة الجزيئية (AHL) Acyl-Homoserine Lactone فقد كانت 57 (98.27%) منتجة لها و كانت عزلة واحدة غير منتجة للأشارة الجزيئية AHL وكان مصدر هذه العزلة هو الدم .

---

4-الكشف عن إنتاج جزيئات AHL في العزلات المحلية بطريقة الصفيحة الدقيقة Microtiter plate.

5-الكشف الجيني عن أنظمة QS ( LasR/LasI ) و ( RhIR/RhII).

6- تحديد القرابة الوراثية Genetic relatedness بين عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* وذلك من خلال

تتميطها جينياً باستعمال طريقة ERIC - PCR

7- التحليل التتابعي Sequencing لجينات استشعار النصاب ( *lasR* و *lasI* و *rhIR* و *rhII* ) في

بكتريا *P.aeruginosa*.