جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى
كلية التربية للعلوم الصرفة
قسم علوم الحياة

التحري عن بعض جينات تكوين الغشاء الحيوي في بكتريا الزائفة الزنجارية المعزولة من مصادر سريرية مختلفة

رسالة مقدمة الى

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

من قبل الطالبة

مروة عماد إبراهيم البدراني

بكالوريوس علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى

2016 - 2017

بإشراف

أ. د. صبا جاسم جواد الزبيدي

1445هـ **2024 م**

Abstract

The study included collecting 114 samples, including 36 burn samples and 78 wound samples from patients hospitalized in Baqubah Teaching Hospital during the period from 9/19/2022 to 12/12/2022. The samples were grown on MacConkey agar media and blood cells. To confirm the diagnosis, the isolates were grown on Cetrimide agar, which is a selective medium for these bacteria.

The diagnosis was made based on morphological characteristics, microscopical identification, and biochemical tests. The results showed that 12 samples (10.52%) showed no growth on the media, while 102 samples (89.47%) showed positive growth, as 32 samples included burns (31%) and 70 wound samples (69%).

The Vitek2 device was used for the purpose of final diagnosis with an accuracy of up to (99%) to ensure that the isolates belong to the Pseudomonas aeruginosa bacteria, as the results showed that 43 isolates (42.16%) were P. aeruginosa, while 59 isolates (57.84%) It belonged to other bacterial species.

The results of the susceptibility test conducted using the Kirby-Bauer disc diffusion method showed 12 antibiotics, and the results were compared according to what was stated in (CLSI, 2021). The resistance percentage was as follows: Amoxicillin by 96%, Ceftazidime by 100%, Cefotaxime by 100%, Ceftriaxone by 100%, Cefepime 75%, Meropenem 76%, Amikacin 82%, Tobramycin 76%, Gentamicin 70%, Erythromycin 94%, Polymyxin B 23% and Ciprofloxacin 47%.

Some virulence factors were investigated. The ability of P. aeruginosa isolates to produce the protease enzyme was 14 isolates (82.35%) able to produce the protease enzyme, while 3 isolates (17.65%) were unable to produce it. As for the production of the gelatinase enzyme, 7 isolates of P. aeruginosa (41.18%) showed their ability to produce the gelatinase enzyme, while 10 isolates (58.82%) were unable to produce it. As for the ability of P. aeruginosa isolates to produce

biofilms using the Micro-titer plate (MTP) method, the results showed that 7 isolates (41%) were strongly biofilm-forming, while 4 isolates (23%) were strong. of moderate biofilm formation, while 6 isolates (35%) had poor biofilm formation.

Four genes were investigated in 17 isolates of P. aeruginosa using Polymerase Chain Reaction (PCR) technology and using specialized primers. These genes are (lasI, rhlR, pslA, pslD), and their presence percentage was as follows: The presence of the lasI gene was (100) %), while the rhlR gene was found at a rate of (100%), the pslA gene was found at a rate of (100%), while the pslD gene was found at a rate of (94%).

DNA sequencing analysis was performed for 10 isolates of P. aeruginosa carrying the lasI gene with a size of 607 base pairs. These isolates were compared with GenBank (NCBI), and the results showed that isolates No. (2) and (5) were identical to those found. In GenBank, it was 100%, while the other eight isolates showed different matching rates as a result of the appearance of mutations in them, which varied between mutations of Transformation, Transition, Addition, and Deletion. One of the mutations of isolate No. (10) was registered in GenBank (NCBI) under the serial number. (LC767910).

A Phylogenetic Tree was built for 10 local isolates of the bacterium P. aeruginosa. The results of the tree were that the genetic distance between isolate 1 and isolate 2 was 0, while the distance between isolate 7 and isolates 3, 6, 8, 5, 10, 4, 9 was 0.00004 - The distance between isolates 3, 6, 8, 5, and 10 and isolates 4 and 9 is 0.00001, and the distance between isolates 3, 6, 8 and isolates 5 and 10 is 0.00254, and the distance between isolates 3, 6 and isolate 8 is 0.00001, and the distance between isolate 3 Isolation 6 is 0.00254, the distance between isolation 5 and isolation 10 is 0.00001, and the distance between isolation 4 and isolation 9 is 0.00001.

1.المقدمة

تظهر بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* تحت المجهر على شكل عصيات سالبة لصبغة كرام وهي بكتريا هوائية اجبارية Obligate aerobic، غير مخمرة لســكر اللاكتوز ومنتجة للعديد من الصــبغات منها البايوســيانين Pyocyanin البايوفيريدين Pyoverdin، وتعد من المســببات المرضــية الانتهازية Opportunistic pathogens وهي واسـعة الانتشـار إذ تصـيب مجموعة واسـعة من الكائنات الحية منها الانســان والحيوانات والنباتات وكذلك تنتشــر في البيئات المختلفة مثل التربة والماء والهواء وقد توجد ملتصقة بالأسطح بفضل امتلاكها للأغشية الحيوية Biofilms (Levinson، 2016; Kahlon، 2016). تعد بكتريا *P. aeruginosa* السبب الرئيس لعدوى المستشفيات إذ تعد ثاني أكثر مسبب للالتهاب الرئوي (Nosocomial Pneumonia) وثالث مســبب لعدوى المســالك البولية (Urinary tract infction) وكذلك المسبب السابع لحالات لتسمم الدم (Septicemia)، إضافة لذلك فأنها تسبب التهابات الحروق (Burns) والتهاب أغشــية الدماغ (Meningitis) (Pedersen وآخرون، 2018; Migiyama وآخرون، 2016).

تمتلك بكتريا *P. aeruginosa* العديد من عوامل الضــراوة Virulence factors وأهمها هو إنتاجها للســموم الخارجية Exotoxins، وكذلك انتاج الصــبغات منها البايوســيانين Pyocyanin البايوفيردين Pyoverdin والتي تعد ســامة للأنواع البكتيرية الأخرى والخلايا البشــرية. ومن عوامل الضــراوة الأخرى امتلاكهـا للمحفظـة (Capsule) والتي تعمـل على حمـايتهـا من عمليـة البلعمـة (Phagocytosis) (Sastry وBhat، 2021; Abdul-Hussein وAltai، 2016)، إضـــافة لذلك فأن مقاومة البكتريا تعود إلى امتلاكها الأغشــية الحيوية Biofilm وطبقة الالجينيت ويســاعد كل منهما البكتريا في مقاومة المضـــادات الحيوية وحمايتها من الظروف غير الملائمة بالإضـــافة لذلك امتلاكها لجينات المقاومة من

أجناس بكتيرية أخرى بوســـاطة البلازميدات Plasmids والعناصـــر القافزة Transposons عن طريق الاقتران البكتيري Conjugation (Hashemi واخرون، 2017).

تعرف المقاومة المتعددة (MDR) Multidrug Resistant بأنها قدرة البكتريا على مقاومة مضــاد واحد على الأقل من ثلاث مجاميع أو أكثر من المضـــــادات الحيوية المختلفة، من بينها مضـــــادات البيتــالاكتــام (β-Lactams) والامينوكلايكوســـــايــد (Aminoglycosides) والفلوروكينولينــات (Fluoroquinolones) والكاربينيم (Carbapenems)، وتعود ظاهرة المقاومة المتعددة للمضـــــادات الحيوية لبكتريا *P. aeruginosa* إلى قدرتها على تكوين الغشـــاء الحيوي (Biofilm)، إضــــافة إلى امتلاكها عدة مجاميع من مضــخات الدفق (Efflux pumps) والنفاذية المحدودة للغشــاء الحيوي وإنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز (β-Lactamase) (Mohamed وآخرون، 2017).

نظام استشعار النصاب (QS) Qourum Sensing في بكتريا *P. aeruginosa* يتكون من نظامين هما نظام *las* ونظام *rhl*، إذ يحتوي نظام *las* على الجين *lasI* والذي يكون مسؤولاً عن التخليق الحيوي لجزيئات الإشــارة (3O-C12-HSL) N-(3-oxododecanoyl) -L- homoserine lactone، بينما يحتوي نظــام *rhl* على الجين *rhlR* إذ إنّ الجين *rhlR* وهو المنظم النســـخي (transcriptional regulator) والذي بدوره ينظم التعبير للعديد من الجينات فضلاً عن ارتباطه بعوامل الضراوة (Kumar وvishwe، 2012; Diggle و Whiteley، 2020).

هنالك العديد من المكونات المهمة الداخلة في تكوين الأغشـــية الحيوية في بكتريا *P. aeruginosa* منها متعدد الســـكريات الخارجية Exopolysaccharides والتي تتضـــمن الالجينيت (Alginate) و(Pel) Polysaccharide encoding locus وPolysaccharide synthesis locus (Psl)، إذ يعمل كل من Pel وPsl على حماية البكتريا من تأثير المضــادات الحيوية، وقد بينت الدراســات إن Psl

يتم تشفيره بوساطة الجين *PslA* والذي توفر الدعم الهيكلي في المرحلة الأولية من تكوين الغشاء الحيوي، وبينت نتائج الدراسات إنّ بروتين pslD يتم تشفيره بواسطة الجين *pslD* والذي هو أحد المكونات الرئيسة في (Polysaccharide synthesis locus (Psl حيث إن بروتين pslD يســــاهم في افراز متعدد الســكريات الخارجية Extracellular polysaccharide الأســاســية للأغشــية الحيوية في بكتريا *P. aeruginosa* (Baker وآخرون، 2016; Jennings وآخرون، 2015).

إن خطورة الأمراض التي تســـببها هذه البكتريا كان دافعاً للعلماء لاســـتخدام التقنيات الحديثة في التشــخيص وإن إحدى أهم هذه التقنيات هي تفاعل البلمرة المتســلســل (Polymerase chain (PCR reaction والتي تعد من أفضــل تقنيات التشــخيص لما تمتاز به من الخصــوصــية والدقة والسـرعة العالية من خلال الكشف عن الجينات المشفرة لعوامل الضراوة وإمكانية اعتمادها كمؤشرات جزيئية في الدراسات التشخيصية (Taee واخرون، 2014).

يعد تحليل التســلســل التتابعي Sequence analysis أحد التطبيقات الرئيســة المهمة للمعلوماتية الحيوية، إذ يســتخدم لتحليل تســلســل النيوكليوتيدات أو البروتينات لأي كائن حي عبر العديد من أدوات المحاذاة مثل FASTA Clustal كما إنه يستخدم في شرح التسلسلات المكتشفة حديثاً واكتشاف المناطق المحفوظة والمناطق التنظيمية الأخرى فيما بينها وكذلك أمكانية التنبؤ بالخصـــائص الفيزيائية والكيميائية (Pathak وآخرون، 2022).

شـجرة النشـوء والتطور (Phylogenetic Tree) هي رسـم تخطيطي يوضـح العلاقات التطورية بين الكائنات الحية المختلفة أو السـلالات ولبناء هذه الشـجرة الوراثية تم اسـتخدام برنامج MEGA7 وهو أحد برامج تحليل الوراثة التطورية الجزيئية وذلك من خلال رســم الشـــجرة الوراثية بشــكل مخطط متفرع يبين العلاقات التطورية بين أنواع الكائنات الحية قيد الدراسة بناءً على أوجه التشابه والاختلاف في خصـائصـها الفيزيائية والجينية وذلك لأنها تعود إلى أصل مشترك (Kumar وآخرون، 2016).

للأهمية التشـخيصـية والعلاجية جاءت هذه الدراسـة للكشـف الجيني عن بعض الجينات المسـؤولة عن تكوين الأغشــية الحيوية في بكتريا الزائفة الزنجارية ذات المقاومة المتعددة للمضــادات الحيوية وقد اتبعت الخطوات التالية لتحقيق هدف الدراسة:

1. عزل بكتريا *P. aeruginosa* من عينات الحروق (Burns) والجروح (Wounds) في مدينة بعقوبة وتم تأكيد التشخيص باستخدام جهاز الفايتك Vitek2.

2. الكشف عن قدرة عزلات بكتريا *P. aeruginosa* على تكوين الأغشية الحيوية (Biofilm).

3. الكشف الجزيئي عن وجود جينات (*lasI*، *rhlR*، *pslA*، *pslD*) في عزلات بكتريا *P. aeruginosa* باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR).

4. التحليل التتابعي (Sequencing) لعزلات بكتريا *P. aeruginosa* الحاملة للجين *lasI*.

5. رســم الشــجرة الوراثية (Phylogenetic Tree) لعزلات بكتريا *P. aeruginosa* ومقارنتها مع بنك الجينات (NBCI).