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

التنميط الجزيئي لبعض جينات الضراوة لبكتريا السالمونيلا المعوية النمط المصلي Typhi ودراسة تاثير بعض المعززات الحيوية على تثبيطها

أطروحة مُقدّمة إلى

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

من قبل

عُلا عبد الكريم كاظم

بكالوريوس علوم حياة/ كلية التربية للعلوم الصرفة ابن الهيثم/جامعة بغداد/2001

ماجستير علوم الحياة/ كلية التربية التربية الاساسية/الجامعة المستنصرية/2015

إشراف

ا.م.د علي جعفر سليم

ا.م.د آمال عزيز كريم

1444 هـ

2023 م

1. المقدمة Introduction

تعد بكتريا Typhi *Salmonella enterica serovar* من اهم المسببات الرئيسية للتسمم الغذائي مسببة احد اهم الامراض المنتقلة بالغذاء حمى التيفؤيد الذي يصيب الانسان، الذي يعتبر من الامراض الشائعة في المجتمع (Booijink ،.2007)، وهو احد المشكلات الموسمية الرئيسية في العالم لاسيما الدول النامية التي يتوطن فيها المرض Endemic countries، والعراق واحد من الدول التي تعاني من هذا المرض سنوياً (Batool واخرون.،2014) تسبب عبئا اقتصاديا عالميا على منظمات الرعاية الصحية، اذ ان اغلب حالات الاصابة من الفئة العمرية دون سن الخامسة (WHO،2015)،هذه البكتريا متطفلة على الإنسان بشكل خاص وهو المضيف الوحيد لها و تصيب أعضاء متعددة منه اذ تغزو الأنسجة اللمفاوية للأمعاء الدقيقة والكبد والطحال ومجرى الدم للإنسان المصاب (Chiu واخرون،.2005).

تمتاز بكتريا Typhi *S.* بإمتلاكها مقاومة متعددة للمضادات الحيوية Multidrug Resistant (MDR) ،إذ إنها تستطيع ان تقاوم اغلب مجاميع المضادات الحيوية المحددة من قبل (CLSI،2020) المستخدمة اتجاه بكتريا الـ Typhi *S.*، ويرجع سبب ظاهرة المقاومة الدوائية المتعددة لبكتريا Typhi *S.* الى إنها تمتلك عدة مجاميع من أنظمة الدفق والقدرة على انتاج إنزيمات البيتالاكتام β–Lactamase والنفاذية المحدودة للغشاء الخارجي (Amankwah واخرون، 2021).

تمتاز هذه البكتريا بامتلاكها العديد من عوامل الضراوة التي يكون لها أثراً في إمرضيتها ومنها: عوامل الالتصاقAdhesion لامتلاكها العديد من الأهداب pilli و السوط القطبي polar flagella فضلا عن دورها في حركة البكتريا فأنها تسهم في أمراضيتها من خلال مساعدتها

على الالتصاق على الأغشية الطلائية ومهاجمة خلايا المضيف (Abdullah واخرون، 2020)، كما تفرز البكتريا مركب لاصق قوي للخارج يسمى الالجنيت Alginate وهو عبارة عن Exopolysaccharide تكون الخلايا مطمورة داخله مكونة الغشاء الحيوي Biofilm الذي يزيد من مقاومتها للمضادات الحيوية (Stokniene واخرون،2022). كما تمتلك عوامل الغزو Invasion المتمثلة بمناطق جينية تشفر لبروتينات تزيد من قدرة البكتريا على غزو الخلايا المعوية الطلائية و مهاجمة الخلايا البلعمية والبقاء بداخلها (Winand واخرون، 2020).

كما تمتلك نظمة افراز هي T1SS و$T3SS_{SPI-1}$ و $T3SS_{SPI-2}$ و $T6SS_{SPI-6}$ تستخدمها البكتريا لحقن المواد الفعالة الى العصارة الخلوية لخلايا المضيف، و افراز بروتينات لها دور في التكاثر داخل الخلوي في الـ macrophages والانتشار الجهازي (Cakar واخرون،2022)، كما تنتج البكتريا نواقل الحديد Siderophores التي تأخذ عنصر الحديد من محيط الأمعاء او المصل لتسهم في نموها (Russo واخرون،2019).

جزر السالمونيلا المرضية SPIs (Salmonella pathogenicity islands)، هي أشرطة جينية كبيرة داخل كروموسوم السالمونيلا تحمل حزمة كبيرة من جينات الضرواة المشفرة لعوامل ضرواتها كالغزو والتكاثر و إنشاء تفاعلات محددة مع آليات دفاع المضيف للبقاء على قيد الحياة داخل الخلية المضيفة، والتي تعمل كوحدة وراثية متوافقة ومتميزة خلال لحظة العدوى للمضيف (Yousafzai واخرون ،2019)، ومن اهم هذه الجينات التي تقع ضمن جزر الامراضية (*invA, iroB, spiC, misL, orfL, pipD, tviA, pilS*)، يعد وجودها محدد أساسي لمقدار ضراوة السلالة وامراضيتها لانها أساسية لغزو المضيف والالتصاق و تعديل الظروف المحيطة وتكوين الغشاء الحيوي داخل او خارج المضيف (Mthembu واخرون Jennings;2019، واخرون،2017).

تميل بكتريا *S.* Typhi لأتخاذ استراتيجية تكوين الأغشية الحيوية، والتي هي عبارة عن مجتمعات بكتيرية معقدة تلتصق على الأغشية الطلائية للأمعاء مما يساعدها للاستمرار داخل المضيف، يتكون الغشاء الحيوي كاستجابة لعدد من العوامل مثل الكثافة الخلوية العالية والظروف البيئية غير الملائمة مثل نقص المغذيات و دفاعات المضيف او اثناء العلاج بالمضادات الحيوية (Stokniene واخرون،2022)، والبكتريا المكونة للغشاء الحيوي مسؤولة عن الإصابات المزمنة والمستعصية لانه يسهم في زيادة الامراضية ، اثبت (MacKenzie واخرون،2017) في دراسة له ان للغشاء الحيوي دور اساسي لبقاء البكتريا فترة أطول بالجسم اذ إن النمو في الأغشية الحيوية يعمل على تعزيز بقائها ويصبح من الصعب تدميرها، مثل استعمار بكتريا *S.*Typhi في المرارة المزمن و بدون اعراض، مما يسمح بانتقالها الى الافراد غير المصابين (Goer واخرون، 2022).

قدم التطور الكبير في علم الأحياء الجزيئي التقنيات الحديثة والسريعة والمتطورة لإيجاد العلاقات الوارثية بين العزلات البكتيرية وتحديد مصدر وطرق العدوى، وبناء على ذلك يتم تقييم فعالية الطرق العلاجية المتبعة للسيطرة على الممرضات و لمنع العدوى وكذلك لتحديد مدى وبائيتها، يضم التنميط الجيني Genotyping طرق عديدة احد هذه الطرق هي طريقة التسلسلات المتكررة المعتمدة على جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل - Repetitive sequence PCR التي تعتمد على وجود تسلسلات متكررة في جينوم البكتيريا كطريقة BOX– Elements (BOX) وتعد من الطرق السهلة المهمة والبسيطة التطبيق واقل تعقيدا في تحميل النتائج من الطرق الاخرى وتستعمل لدراسة الصلة الوراثي Genetic relatedness للعديد من الأنواع البكتيرية خاصتا في مجال الدراسات الوبائية وكذلك دراسة الصلة بين العزلات المرضية والبيئة ايضاً، (Nisheeth و Radhika ،2021).

تعد بكتريا حامض الاكتك *Lactobacillus* بديل امن وصحي للمضادات الحيوية استقطبت الكثير من الدراسات الحديثة، اعتبرت منظمة الصحة العالمية World Health Organization (W.H.O.) بكتريا المعززات الحيوية النظام الدفاعي الحديث الأكثر أهمية عندما تصبح المضادات الحياتية عديمة الجدوى(Zommiti واخرون ،2020)، حيث تعمل المعززات على الإبعاد التنافسي Competitive exclusion للأحياء المجهرية الممرضة على المغذيات المحدودة أو التنافس على العدد المحدود من مستقبلات الالتصاق على سطوح الخلايا الطلائية وتحفيز الاستجابة المناعية (Adetoye واخرون،2018). تمتاز بكتريا الـ *Lactobacillus* بتحملها لظروف الاجهاد المختلفة ، تقاوم وسط المعدة الحامضي و بيئة الامعاء الدقيقة وعصارة البنكرياس عند مرورها في الجزء العلوي من القناة الهضمية (Oh واخرون،2018)، وتميل للالتصاق على الخلايا المبطنة للامعاء يمنع هذا الارتباط غزو البكتريا المسببة للامراض(Marras واخرون،2021)، ترجع خاصية هذه البكتريا التثبيطية ضد البكتريا المرضية *S.*Typhi ،لانها تنتج مضادات ميكروبية منها حامض اللاكتيك ، حامض الخليك ، بيروكسيد الهيدروجين و البكتريوسينات، كما اثبتت الدراسات العلمية ان الراشح الخالي من الخلايا (CFS) Cell free supernatant له فعل تضادي تجاه عدد من الممرضات مثل *Escherichia coli* و *Vibrio cholera* (Matejčeková واخرون،2016)، لهذا يتم اللجوء الى بدائل علاجية مثل المعززات الحيوية Probiotics التي تتميز انها ذات تاثير قاتل لبكتريا الـ *S.* Typhi ومثبط لأنتاج الغشاء الحيوي وليس لها اثار جانبية بالإضافة الى ان وجودها داخل الجسم له فوائد متعددة (DaSilva وآخرون،.2011) .

.

وبناءً على ما تقدم جاءت دراستنا الحالية لتهدف الى :

1. الكشف عن تكوين الغشاء الحيوي ودراسة بعض العوامل الفيزيائية والكيميائية المؤثرة عليه
2. الكشف الجزيئي لبعض جينات عوامل الضراوة ضمن الجزر الامراضية لبكتريا *S.*Typhi
3. التنميط الجزيئي لبكتريا *S.*Typhi المعزولة من مصادر سريرية بأستعمال تقنية BOX-Primer .
4. تحديد درجة الصلة الوارثية Genetic relatedness بين عزلات الدراسة الحالية من جهة وبين عزلات بنك الجينات من جهة أخرى اعتمادا على التسلسل التتابعي للجين 16SrRNA.
5. اختبار فعالية تاثير بكتريا *Lactobacillus spp* على تثبيط بكتريا *S.*Typhi.

الخلاصة: Summary

أجريت الدراسة في الفترة من شباط سنة 2020 إلى تشرين الاول سنة 2020 جمعت 100 عينة (60) عينة دم و (40) عينة براز من المرضى المشتبه باصابتهم بحمى التيفوئيد لكلا الجنسين من الفئة العمرية (5 اشهر الى 60 سنة) من مختبرات المستشفيات المختلفة ,وتضمنت مستشفى مدينة الطب ,النعمان ,اليرموك والكندي في محافظة بغداد, مختبر الصحة العام في محافظة السليمانية، و تم تشخيص عزلات السالمونيلا التيفوئيدية من خلال الطرق التقليدية بما في ذلك الفحوصات المظهرية من الفحص المجهري و الزرعي وايضاً تم تأكيد التشخيص بواسطة نظام الـ Vitek2 compact وأظهرت النتائج ان 48 عزلة تعود لبكتريا *Salmonella* Typhi

اختبرت حساسية العزلات اتجاه 12 مضاد حيوي وفق طريقة الأقراص Kirby-Bauer و أظهرت العزلات مدى واسع ومختلف من المقاومة، اذ قاومت جميع العزلات المضادات (Nalidixicacid , Ceftriaxone , Ceftazidime , Cefotaxime) بالنسب (100 , 97.90, 97.90, 95.80) % على التوالي ، وقاومت بنسبة اقل المضادات (Azithromycin , Levofloxacin , Ciprofloxacin , Ofloxacin) بنسبة (39.60 ، 37.50, 37.50, 37.50) % على التوالي ، اما مقاومتها للمضادات (Trimethoprim ,Chloramphenicol Trimethoprim , sulfamethoxazoles) كانت اقل بنسبة مقاومة (16.70, 4.20, 4.20)% على التوالي، اما مضاد Fosfomycin فقد كانت جميع العزلات حساسة له، كما أبدت اغلب العزلات مقاومة متعددة للمضادات الحيوية Multiple drug resistance (MDR) وبنسبة 60.41% .

اختبرت قابلية العزلات على تكوين الغشاء الحيوي بطريقتين ، الطريقة الأولى طريقة الكونغو الاحمر و كانت نسبة الإنتاجية 6.25% ، و طريقة اطباق المعايرة الدقيقة على وسط مرق تربتون الصويا Tryptic soya broth (TSB) وكانت نسبة الإنتاجية 95.83% ، توزعت مابين شديدة

الإنتاجية بنسبة 87.5% ، متوسطة الإنتاجية 6.25% و ضعيفة الإنتاجية 6.25 % و غير منتجة 4.2% .

تمت دراسة تأثير بعض العوامل على انتاج الغشاء الحيوي لتحديد الظروف المثلى لانتاجه وتضمنت درجة الحرارة و مدة الحضن، اظهرت النتائج ان افضل انتاج للغشاء عند درجة حرارة 37°م و 40°م و بمدة 48 ساعة حضن و بدون الحاجة الى مصدر كاربوني المتمثل بسكر الكلوكوز او السكروز وعلى وسط TSB بطريقة اطباق المعايرة الدقيقة .

كما تم الكشف عن قابلية بكتريا *S. Typhi* لتكوين الغشاء الحيوي على الدم الطازج ومكوناته و اظهرت النتائج ان العزلات منتجة للغشاء الحيوي بنسبة 100% , وكان افضل وأعلى انتاج للغشاء على كريات الدم الحمراء مقارنة مع باقي مكونات الدم .

استخدم تفاعل البلمرة المتسلسل للكشف عن جينات الضراوة (*invA، iroB، spiC، misL، orfL، pipD، tviA، pilS*) للـDNA المستخلص من 48 عزلة لبكتريا *S. Typhi* ,وكانت نسب تـــردد الجينـــات (100%، 95.83%، 91.66%، 66.66%، 27.08%، 20.83%، 4.1%، 4.1%) على التوالي.

لغرض تحديد درجة القرابة الوراثية اجري التنميط الوراثي باستخدام Box-primer , اذ اشارت النتائج الى وجود 26 حزمة تتراوح اطوالها بين (200– 2450) زوج قاعدي, مما يدل على وجود أنماط وراثية عديدة متنوعة بين العزلات قيد الدراسة.

بين التحليل الوراثي لتسلسلات جين *16srRNA* الى وجود طفرات وراثية وفي مواقع مختلفة على طول التسلسل النيوكلوتيدي , وكانت من نوع طفرة الحذف Deletion mutation و الاستبدال Transversion mutation والانتقال Transition mutation ، تمكنا من خلالها الى تسجيل عزلتين ذات تسلسلات نكليوتيدية فريدة لجين *16SrRNA* في المركز الوطني لمعلومات التقانة

الحيوية NCBI الاولى تحمل الرمز OM919679.1 والثانية تحمل الرمز OM919546.1 ، كما تفرعت شجرة النشؤ والتطور المبنية على أساس التسلسل النيوكليوتيدي للجين *16SrRNA* الى اربع مجاميع فرعية وكانت العزلة العالمية (MT509427.1) من بنكلادش هي السلف المشترك لجميع العزلات .

اختيرت المعززات الحيوية من العصيات اللبنية كل من البكتريا *Lactobacillus rhamnosus* GG و *Lactobacillus plantarum* لاختبار قدرتها التثبيطية اتجاه بكتريا *S.* Typhi وخاصة المتعددة المقاومة منها كبديل علاجي امن وفعال عن المضادات الحياتية المعروفة ، اختبر العالق و الرائق والبكتريا الحية لكلا النوعين بطريقة الانتشار بالحفر فاظهرت النتائج الاثر المثبط لكلا العزلتين من العصيات اللبنية لكن هناك تباين في هذا الأثر حسب نوع ومكون العزلة ، اذ كانت القدرة التثبيط لعالق بكتريا LGG هو الافضل .

تم دراسة تأثير المواد التي تنتجها العصيات اللبنية للكشف عن المكون ذي التاثير القاتل ،اظهرت النتائج انه يعود لفعل البكتريوسين بالدرجة الاساس ، وكانت النسبة الاكثر فعالية لعالق بكتريا LGG ضد بكتريا *S.* Typhi هي (1:1) .

تم التحري عن الفعالية التثبيطية لعالق العصيات اللبنية LGG على تكوين الغشاء الحيوي ، أظهرت النتائج ان نسبة تثبيط تكوين الغشاء الحيوي بوجود العالق كانت بنسبة 99.97%.