جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

الكشف الجزيئي عن الجينات المشفرة لتكوين الأغشية الحيوية في الزائفة الزنجارية المعزولة من المرضى

رسالة مقدمة إلى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في

علوم الحياة

من قبل الطالبة

دعاء محمد رضا الجوراني

بكالوريوس علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة/

جامعة ديالى 2016

بإشراف

أ. م. د. **علي جعفر سليم**   أ. م. د. **آمال عزيز كريم**

2024 م   **1445 هـ**

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
and Scientific Research
University of Diyala
College of Education for Pure Science
Biology Department

Molecular Detection of Biofilm Encoding Genes in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Patients

A Thesis

Submitted to the Council of College of Education for Pure Science, University of Diyala in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master Degree of Science in Biology

By

Duaa Mohammed Ridha Al-Jorany

B.Sc. Biology/ College of Education for Pure Science
University of Diyala 2016

Supervised By

Dr. Ali Jaffar Saleem	**Dr. Amal Aziz Kareem**
Assist. Prof	**Assist. Prof**

2024 AD **1445 AH**

1. المقدمة Introduction

الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* هي بكتيريا منتشرة بيئياً. ظهرت على أنها أحد أكثر مسببات الأمراض الإنتهازية ذات الصلة السريرية الرئيسة. وهي من أكبر مسببات الأمراض العامة في المستشفيات، وقد ساهمت على نطاق واسع في العدوى الإنتهازية الشديدة، خاصةً في المرضى الذين يعانون من ضعف المناعة (Abd Al-Mayali و Salman, 2020). وفقًا لمركز السيطرة على الأمراض، تم تسجيل أكثر من 51000 إصابة سريرية بالزائفة الزنجارية كل عام في الولايات المتحدة مع 400 حالة وفاة سنويًا (CDC، 2018).

تعد الزوائف الزنجارية بكتريا عصوية هوائية سالبة لصبغة كرام, متحركة بوساطة سوط قطبي واحد وغير مكونة للأبواغ. تنتج الزوائف الزنجارية مجموعة متنوعة من الصبغات، و أهمها صبغة البايوسيانين Pyocyanin (الأزرق المخضر) (Sameet وآخرون, 2020). تسبب هذه البكتيريا عدة أنواع من العدوى بما في ذلك التهابات الجروح, والجهاز البولي, والجهاز التنفسي, وقد تستعمر أيضاً في البشر الأصحاء من دون التسبب في المرض. تتزايد الإصابات بهذه البكتيريا في جميع أنحاء العالم بسبب آليات البقاء والتكيف والمقاومة لأنواع مختلفة من مضادات الميكروبات (Abdallah و Gabur، 2021). يصعب علاج عدوى الزائفة الزنجارية بشكل خاص بسبب العديد من الآليات الذاتية والمكتسبة لمقاومة المضادات الحيوية (Wijaya، 2021). تعد عدوى الزائفة الزنجارية مشكلة كبيرة نظراً لمقاومتها الذاتية والمكتسبة للعديد من مجموعات المضادات الحيوية الفعالة. تُعزى مقاومتها المتعددة للمضادات إلى النفاذية المحدودة للغشاء الخارجي،

وإنتاج إنزيمات β–lactamase ونظام الدفق المتعدد الأدوية (Mohamed وآخرون, 2019).

يعتمد الطيف الواسع للعدوى التي تسببها الزائفة الزنجارية على وجود العديد من عوامل الضراوة مثل تكوين الأغشية الحيوية Biofilms. يتم تعريف الأغشية الحيوية على إنّها تجمعات منظمة من البكتيريا أحادية أو متعددة الأنواع التي تلتصق بالأسطح الحية أو غير الحية (Da Costa وآخرون، 2021), وتعد قدرتها على تكوين الأغشية الحيوية على الأسطح الحية, وغير الحية عاملًا مهمًا يساهم في التسبب في الإصابة بالزوائف الزنجارية (Saffari وآخرون، 2017). تتكون مصفوفة الأغشية الحيوية البكتيرية من بوليمرات مختلفة, مثل عديدات السكريد الخارجية, و البروتينات, والحمض النووي خارج الخلية (eDNA). تعد عديدات السكريد الخارجية والبيوسيانين والبروتينات الوظيفية من العوامل التي تساهم في تطوير إستقرار وحماية الغشاء الحيوي للزوائف الزنجارية (Hynen وآخرون, 2021). تمتلك الأغشية الحيوية ميزة في العديد من الإصابات وتعزز بشكل كبير قدرة البكتيريا على مقاومة المضادات الحيوية والظروف البيئية القاسية (Sameet وآخرون، 2020). يُعد تكوين الأغشية الحيوية آلية مهمة لبقاء الزائفة الزنجارية وتمثل علاقتها بمقاومة مضادات الميكروبات تحدياً لعلاجات المرضى (Costa –Limaa وآخرون, 2018).

تكشف مرونة وتعقيد جينوم الزوائف الزنجارية الكبير (6.5 مليون زوج قاعدي) التكيفات التطورية التي تحدثت مع هذا النوع من ضمنها التغيرات في التمثيل الغذائي والتكيف مع العديد من البيئات المختلفة وأنظمة إصلاح عدم التطابق mismatch repair systems (Mahmood وآخرون, 2020). حيث يتكون من جينوم أساسي محفوظ مع

مناطق سلالة خاصة تسمح للسلالات بفقدان أو إكتساب أجزاء جينومية لتحسين سمات البقاء والتكيف في بيئات مختلفة (Wendt و Joon–Heo, 2016). يعد التخليق الحيوي للألجينات alginate biosynthesis أحد المكونات الأساسية لتكوين الأغشية الحيوية في الزائفة الزنجارية. و يعد مشغل alg–D، مسؤولاً عن الإنتاج النهائي للألجينات، المشفرة بوساطة جين *algD*، هي نوع شائع من عديد السكريد وتوجد في بنية الأغشية الحيوية (Farhan وآخرون, 2023). و إنّ التخليق الحيوي للسكريات الخارجية المعروفة بإسم موضع ترميز السكاريد (pel) وموضع تخليق السكاريد (psl)، تعد من أهم السكريات الخارجية الأساسية التي يتم إستغلالها في تكوين الأغشية الحيوية في البكتيريا (Moradali و Rham، 2019). يحتوي مشغل Psl على 15 جينًا (pslA–O) تشارك في تخليق عديد السكريد الخارجي (EPS) وهو أمر مهم لتكوين غشاء حيوي لهذه البكتيريا. الجين المهم الآخر لتكوين الأغشية الحيوية وتطويرها وصيانتها هو جين *Pel* حيث يتكون من سبعة عوامل جينية (pelA–G) ويشارك في تكوين الغشاء الحيوي (Zimmer وآخرون، 2013). وكما يعتبر جين *fliC* أحد الجينات الرئيسة في إنتاج الأسواط نظرًا لدوره في تشفير بروتين الوحدة الفرعية، فلاجيلين. يساهم المركب السوطي في الإنجذاب الكيميائي والحركة العشوائية و إكتساب العناصر الغذائية الأساسية من خلال التعلق بالأسطح و يساهم في إحداث العدوى(Suriyanarayanan وآخرون، 2016).

تهدف الدراسة الحالية إلى تحديد الجينات المختلفة المسؤولة عن تكوين الاغشية الحيوية (*fliC ,algD ,pslD ,pelF*) في عزلات الزوائف الزنجارية التي تم عزلها من التهابات الحروق, و الجروح, و الإدرار, و الأذن الوسطى, و القشع, و الدم, وحسب الخطوات الآتية:

1. عزل وتشخيص الزائفة الزنجارية مظهرياً وجينياً بإستخدام جين *16SrRNA* من عينات سريرية مختلفة.

2. تحديد حساسية عزلات الزائفة الزنجارية للمضادات الحيوية وتحديد التركيز المثبط الأدنى MIC لمضاد Polymyxin B.

3. الكشف عن بعض عوامل الضراوة وفحص قابلية عزلات الزائفة الزنجارية على تكوين الأغشية الحيوية Biofilm.

4.الكشف عن جينات المسؤولة عن تكوين الاغشية الحيوية (*fliC ,algD ,pslD ,pelF*) في عزلات الزوائف الزنجارية.

5. إجراء التحليل التتابعي لجين *16SrRNA* لخمس عزلات تحت الدراسة.

Summery

The current study include the diagnosis of 50 isolates of *Pseudomonas aeruginosa* out of (250) clinical specimens from wounds, burns infection, urinary tract infection, sputum and ear swab specimens from patients attended Baqubah Teaching Hospital, Baladruz General Hospital, and Al-Batoul Teaching Hospital / Diyala Governorate, during the period from September 2022 to January 2023. Identification of the isolates was carried out using microscopical, cultural characterization and biochemical tests, and further identification was carried out by detection of diagnostic gene *16SrRNA*. The results of virulence factors tests showed that all the isolates were producer for hemolysin, protease and biofilm.

The antibiotics sensitivity test was performed using 7 antibiotics including Cefepem, Ceftazidim, Azetronam, Piperacillin-tazobactam , Meropenem, Amikacin and Ciprofloxacin. The rates of resistance were . respectively and 40% %52 ,%54 ,%66 ,%72 ,%80 ,%88The minimum inhibitory concentration (MIC) for Polymyxin B ranged 2-16 .mg/ml The results revealed that 64% of isolates were MDR while 18% were XDR. The relationship between all bacterial isolates under study was found using a Dendogram.

Biofilm-production was assessed using three different ways: congo red agar method results revealed that only 16 (32%) were biofilm producer while tube method results revealed that all isolates (100%) were biofilm producers and the quantitative microtiter plate method results showed that 100% of isolates were positive for biofilm production in different levels, distributed into 16 (32%) strong biofilm producer 19 (38%) intermediate, and 15 (30%) weak. The ability of *Pseudomonas aeruginosa* to form biofilms on expired human red blood corpuscles and serum was also detected in five

isolates, and the results showed that all isolates were 100% biofilm producers. Red blood corpuscles had a higher rate of biofilm formation than serum, and the results also varied between blood groups where blood group AB was the highest in productivity on RBCs, followed by O, B and A respectively. The results also varied between the blood groups in the serum, as the O and AB group were the most productive in the blood serum, followed by B and A, respectively.

Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the genes (*algD*, *pelF*, *pslD* and *fliC*) which are involved in biofilm formation, contributing to surface adhesion, microcolony formation and spreading. The results showed 96% of the isolates had *algD* gene while 100% of isolates had *pslD* gene, also 88% of isolates had pelf gene and 58% of isolates had *fliC* gene.

The genotype pattern for biofilm formation showed 58% (n = 14) of the isolates had *algD-pslD-pelF-fliC* pattern from different isolation sources. The *algD-pslD-pelF* pattern appeared in 7 isolates (29%), and *algD-pslD* pattern appeared in two isolates (8.3%). Meanwhile, one isolate showed the pattern *pslD* only. DNA sequencing of *16SrRNA* gene was conducted for five isolates, and the results revealed the presence of a number of Point mutations. These isolates were registered on NCBI website with register numbers LC777471.1, LC777472.1, LC777470.1, LC777473.1, and LC777474.1 for isolates numbered 11 and 19. And 22, 37, and 42, respectively, which indicates the presence of unique sequences in the local isolates under study.