التحري عن جين *kps* في بكتريا *Acinetobacter baumannii* المعزولة من حالات سريرية مختلفة

رنا مجاهد عبدالله[1] و رشا زياد طارق احمد[2]

[1،2]كلية التربية للعلوم الصرفة ابن الهيثم - جامعة بغداد

الخلاصة

تم الحصول على (40) عينة لبكتريا *Acinetobacter baumannii* من اصل (200) عينة جمعت من حالات مرضية مختلفة شملت الجروح والحروق والخروج والتهابات المجاري البولية والتهابات المسالك التنفسية وتجرثم الدم . أظهرت نتائج التحري عن جين *kps* في بكتريا *Acinetobacter baumannii* ان (6) عزلة وبنسبة (15)% كانت تمتلك جين *kps* ، واظهرت (4) عزلة وبنسبة (10) % من حالات الخروج و(1) عزلة وبنسبة (2.5) % من التهاب المسالك التنفسية و(1)عزلة بنسبة (2.5) % من الجروح في حين بينت النتائج عدم احتواء العزلات المعزولة من التهابات المجاري البولية ، والحروق ، وتجرثم الدم على جين *kps* وكان الحجم الجزيئي للجين *kps* هو 272 زوج قاعدة بعد ترحيله كهربائيا.

الكلمات المفتاحية :- بكتريا ، عوامل الضراوه ، جين *kps*.

Genotype detection of *kps* gene of *Acinetobacter baumannii* isolated from different clinical cases

Rana Mujahid Abdullah[1] and Rasha Zaid Tariq[2]

[1,2]Department of Biology- College of Education Ibn-Al Haitham- University of Baghdad

[1]dr.rana_alshwaikh@yahoo.com

Received: 7 March 2017 **Accepted: 21 May 2017**

Abstract

Forty isolates were obtained of *Acinetobacter baumannii* from (200) isolate, the isolates were collected from different cases including :- wounds, burns, Stool , Urinary tract infection urine, Respiratory tract infection and blood sample. The result revealed that the *kps gene* was present in (6) isolates (15%) of *Acinetobacter baumannii*. The result Showed (4) isolate (10%) of Stool has *kps* gene and (1) isolate (2.5%) of respiratory tract infection f has *kps* gene and finally only (1) isolate (2.5%) of Wound infection. While all isolated for each of the urinary tract infections, blood and Burns doesn't the *kps* gene. The gel electrophoresis showed that the molecular weight of *kps* gene was 272 bp.

Key Words:-Bacteria, Virulence factors, *kps gene*.

المقدمة

تتصف بكتريا جنس *Acinetobacter* بكونها سالبة لصبغة غرام ،هوائية اجبارية Strict aerobic، موجبة لاختبار الكتاليز ، سالبة لاختبار الاوكسيدز ، غير متحركة non-motile الا ان بعض انواعها تابعة لهذا الجنس تتمتع بنوع من الحركة الارتعاشية Twitching Motility وذلك لوجود الخمل قطبية polar fimbriae (1 ، 2). تعد هذه البكتريا من الممرضات الانتهازية تكون مسؤولة عن العديد من اصابات المكتسبة في المستشفيات opportunistic nosocomial infection وتشمل اصابات ذات الرئة Pneumonia ، اصابات الحروق burns والجروح wound ، تجرثم الدم Septicemia ، التهاب شغاف القلب endocarditis ، التهاب المجاري البولية Urinary tract infection (3 ، 4). ان العديد من عوامل يكون لها اثرا في زيادة خطورة وامراضية هذة البكتريا منها عمر المريض ،طول فترة رقوده في المستشفى ، مقاومتها للمضادات الحيوية ، العلاج الطويل للمضادات الحيوية واسعة الطيف وادوية كبح مناعة فضلا عن اصابة بالامراض المزمنة كالقلب والسكري والضغط جميعها لها اثرا في زيادة امراضية هذة البكتريا (5 ، 6).

يضم جنس *Acinetobacter* عدة انواع يعد نوع *A. baumannii* اكثر الانواع امراضية هذه البكتريا امتلاكها العديد من عوامل الضراوة التي تساعدها في احداث الاصابة منها المحفظة (capsule) وتكوينها للغشاء الحيوي Biofilim وانتاجها للأنزيمات مثل انزيم المحلل للدهون lipase ، انزيم محلل للبروتين protease، وانزيم محلل للجلاتين Gelatinase activity ، وتكوين Pellicle assay ، حوامل الحديد Siderphores، وانتاجها للكولسين Colicin ، وتكوينها للسكريات المتعددة Polysaccharide ، والالتصاق بالخلايا الحية والسطوح غير الحية (7 ، 8). تعد المحفظة من عوامل الضراوة التي تمتلكها بكتريا *A. baumannii* والتي يمكن مشاهدتها بسهولة باستخدام الحبر الهندي حيث تحاط الخلايا بطبقة مخاطية تتكون من سكريات عديدة polysaccharide التي تقع في البكتريا سالبة لصبغة غرام الى الخارج من الغشاء الخارجي (9) تقوم المحفظة بالعديد من وظائف منها حماية الخلية البكتيرية من الجفاف ، كما تعد

اهم عوامل الالتصاق غير الهدبية في البكتريا ، كما تسهل تشكيل الغشاء الحيوي في البيئة ، تساعد على التصاق البكتريا على القنطرة من قبل المرضى الراقدين في المستشفيات مما يزيد من حالات عدوى في المستشفيات ، يساهم وجود الاهداب مع المحفظة في التصاق البكتريا بالخلايا الطلائية والاغشية مخاطية للمسالك البولية والتنفسية والمعوية للإنسان (10) اشارت العديد من الدراسات الى وجود علاقة بين كبسولة وإمراضيه البكتريا اذ ان السلالة الحاوية على المحفظة تكون ممرضة اما البكتريا الفاقدة للمحفظة تصبح غير ممرضة (11) ان وجود المحفظة يفسر قدرة البكتريا على البقاء في البيئة الطبية سواء على الاجهزة الطبية مثل القنطرة البولية وانابيب التنفس او على الاسطح مثل الاثاث واغطية الاسرة الموجودة في بيئة المستشفيات (12) ان الجين *kpsM* الذي يشفر عن انتاج المحفظة في بكتريا *A. baumannii* يعمل على حماية الخلية البكتيرية من عملية البلعمة Phagosytosis ومن مكونات النظام المتمم Complementary system Components (13) وجاءت اهداف البحث الى عزل وتشخيص بكتريا *A. baumannii* من حالات مرضية مختلف والتحري عن جين *Kps* المشفر للكبسولة وتأثيره في ضراوة البكتريا .

المواد وطرائق العمل

1. **عزل البكتريا :** تم جمع (200) عينة من حالات مرضية مختلفة وهي (الجروح ؛ الحروق ، الخروج ؛ التهاب المسالك البولية ؛ التهابات المسالك التنفسي ؛ تجرثم الدم) ومن عدة مستشفيات في بغداد (مستشفى الطفل المركزي التعليمي ، مستشفى بغداد التعليمي ، مستشفى حماية الطفل ، مستشفى الكرامة ، مستشفى الامام علي ، مستشفى اليرموك التعليمي ، مستشفى الكرخ العام ، مستشفى الحروق والجروح والمختبرات التعليمية / مدينة الطب) للفترة من 2016/9/1 لغاية 2016/11/30.
2. **تشخيص العزلات:** تم تشخيص العينات باستخدام الاوساط الزرعية Blood agar و MacConkey agar واستعملت الفحوصات البايوكيميائية مثل Catalase و Oxidase وللتشخيص النهائي للعزلات تم استخدام نظام API 20E و نظام Vitek 2 (14).
3. **عزل DNA:** تم استعمال عدة خاصة لاستخلاص DNA الجينومي (Wizard ® Genomic DNA Purification Kit) من عزلات البكتريا وحسب تعليمات الشركة المصنعة Promega (USA).
4. **الكشف عن جين kps :** حضر محلول البادئ للجين kps F و kps R حسب تعليمات الشركة المصنعة Alpha(DNA) باستعمال الماء المقطر الايوني المعقم للحصول على تركيز 100 بيكومول/ مايكروليتر وحضر محلول كل بادئ بشكل منفصل بتركيز 10 بيكومول/ مايكروليتر وذلك بأخذ 10 مايكروليتر من محلول البادئ الخزين Stock واضافة له 90 مايكروليتر من الماء المقطر اللأيوني وحفظ مع المحاليل الخزينة Stock للبوادئ في درجة الحرارة – 20 م° مع مراعاة مزج محلول البادئ بعد اخراجه من الثلج بأستعمال المازج لمجانسته قبل الأستخدام.
5. **تفاعل البلمرة المتسلسل PCR :** باستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وبالظروف التفاعلية الموضحة في جدول رقم (1).

جدول (1) : البادئ المستعمل في هذه الدراسة والظروف التفاعلية المستعملة في تفاعل البلمرة المتسلسل PCR

المصدر	Product size (bp)	Primer sequence ´5 ⟶ ´3		primer
Johnson and Stell (2000) (15)	272	GCGCATTTGCTGATACTGTTG	F	*kps*
		CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	R	

6. **التحري عن جين kps:-** تم اجراء خطوات التضاعف للتحري عن جين kps حسب ماورد في (15) وتم تحوير بالبرنامج على النحو الاتي الخطوه الاولى تضمنت:- (دورة واحدة فقط لمدة 6 دقائق عند درجة حرارة 94 م º للمسخ الاولي DNA القالب) اما الخطوه الثانية تضمنت:- (34 دورة وشملت A:- (50 ثانية عند درجة حرارة 94 مº لمسخ DNA القالب templateDNA) B:- (70 ثانية عند درجة حرارة 55مº لكي يتم ارتباط البوادئ مع DNA قالب (وقد تم تحور بالبرنامج في هذه الخطوه)) وC :- (55 ثانية عند درجة حرارة 72مº ليتم استطالة البوادئ المرتبطة) اما الخطوة الثالثة تضمنت (دورة واحده فقط ولمدة 10 دقائق وبدرجة حرارة 72 مº للاستطالة النهائية لشريط DNA المتضاعف).
7. **فصلت نواتج التفاعل باستخدام الاكاروز** (Bio Basic INC (Canada بتركيز 2% الحاوي على 5 مايكروليتر من صبغة Eithidium bromide Bio Basic INC (Canada) وباستعمال DNA ladder (100-1500) زوج قاعده وبفرق جهد 100 فولت لمدة 80 دقيقة وتم التصوير باستخدام UV light Optima (Japan).(16).

النتائج والمناقشة

بعد اجراء الاختبارات اللازمة لتشخيص البكتريا وبالاعتماد على (14) تم الحصول على (40) عزلة تعود الى بكتريا *Acinetobacter baumannii* جمعت من حالات مرضية مختلفة من اصل 200 عينة وشملت حالات الخروج (14) عزلة وبنسبة (35%) تليها تجرثم الدم (9) عزلة بنسبة (22.5 %) التهابات الحروق (8) عزلة وبنسبة (20%) والتهابات الجروح والتهابات المسالك التنفسية (4) عزلات وبنسبة (10%) لكل منهما ، واخيرا التهابات المجاري البولية اذ كانت عزلة واحد فقط وبنسبة (2.5) %كما موضح في جدول (2). تعد بكتريا *Acinetobacter baumannii* من اكثر انواع البكتريا التي تسبب حالات تسمم الدم Septicemia وبعدها تاتي اصابات الجهاز التنفسي (respiratory tract) وعزلت من اصابات ذات الرئة المكتسبة من المستشفيات (nosocomial pneumonia infection) ومن حالات (Continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD)) (17).

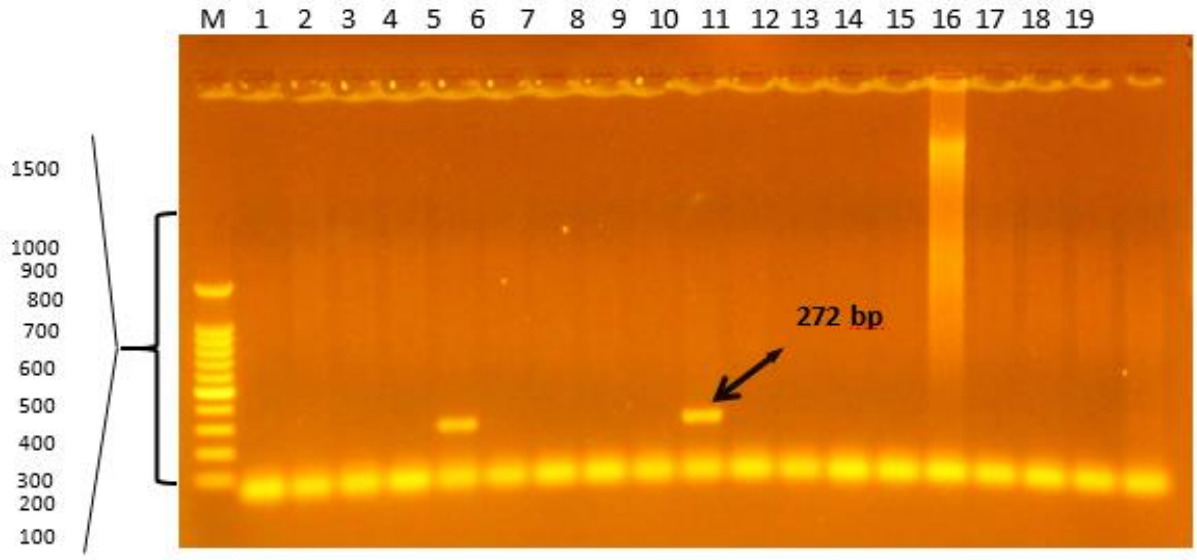
جدول (2) مصدر والعدد والنسب المئوية لعزلات بكتريا *Acinetobacter baumannii*

ت	مصدر عزلات بكتريا *A. baumannii*		عدد العزلات	النسب المئوية %
1	تجرثم الدم	Bacteremia	9	22.5
2	التهاب المسالك التنفسية	Respiratory tract Infection	4	10
3	الجروح	Wounds	4	10
4	الحروق	Burns	8	20
5	الخروج	Stool	14	35
6	التهاب المسالك البولية	UTI	1	2.5
	العدد الكلي	Total	40	100

أظهرت نتائج التحري عن جين الكبسولة *kps* في بكتريا *Acinetobacter baumannii* ان (6) عزلة وبنسبة (15) % كانت تمتلك هذا الجين ، واظهرت (4) عزلة وبنسبة (10) % من حالات الخروج وعزلة واحده فقط من التهاب المسالك التنفسية والتهابات الجروح وبنسبة (2.5) % لكل منهما ، في حين بينت النتائج عدم احتواء كل من العزلات المعزولة من التهابات المجاري البولية والتهابات الحروق وتجرثم الدم على جين *kps* وكان الحجم الجزيئي للجين *kps* هو 272 زوج قاعدة بعد ترحيله كهربائيا وكما موضح بالجدول (3) والشكل (1). ان إمتلاك البكتريا للمحفظة يمكنها من مقاومة الظروف البيئية غيرالملائمة كالحرارة والجفاف ، ويساعدها على البقاء حية على الاجسام الحية وغيرالحية الموجودة في المستشفيات وهذا ما أكده (12). ، فيما اوضح (18) إمتلاك معظم سلالات بكتريا *Acinetobacte* ولاسيما النوع *A. baumannii* المعزولة من حالات مرضية للمحفظة واتفقت النتائج مع (2) الذي بينت امتلاك 17 عزلة فقط وبنسبة (14.04)% من عزلات بكتريا *Acinetobacter baumannii* لجين *kps* والمعزولة من حالات مرضية مختلفة شملت التهاب المجاري البولية ومن الدم ومن سائل النخاع الشوكي وان امتلاك البكتريا لعوامل الضراوة عديدة يجعل منها بكتريا صعبة السيطره عليها وكذلك صعوبة ايجاد العلاج لها وبين (10) امتلاك البكتريا لطبقة متعدد السكريات Polysaccharide والتي تغلف الخلية وتعرف بالكبسولة ويشفر عن انتاج الكبسولة الجين *kps MT* والذي يعد من عوامل الضراوة لهذه البكتريا وتعمل الكبسولة على حماية الخلية البكتيرية من الجفاف ، كما تعد اهم عوامل الالتصاق غير الهدبية في البكتريا ، كما تسهل تشكيل الغشاء الحيوي.

جدول (3) يبين العدد والنسبة المئوية لامتلاك بكتريا *A. baumannii* لجين *kps gene*

ت	المصدر Source	التي تمتلك جين *kps gene* (%)
1	تجرثم الدم Blood bacteremia	0
2	التهاب المسالك التنفسية Respiratory tract Infection	(2.5)1
3	الجروح Wound	(2.5)1
4	الحروق Burns	0
5	الخروج Stool	(10)4
6	التهاب المسالك البولية UTI	0
	العدد الكلي Total	(15)6



شكل(1) يوضح الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل PCR لعزلات بكتيريا *A. baumannii* وباستعمال البادئ النوعي للجين *kps gene* (272 زوج قاعدة) على هلام الاكاروز بتركيز 1% وفرق جهد 100 فولت/ 80 دقيقة M : يمثل الدليل الحجمي (100-1500) زوج قاعدة ، (5 ، 10 نتيجة موجبة) تمثل ناتج تضخيم الجين *kps gene* لعزلات بكتيريا *A. baumannii* (1،2، 3، 4، 6، 7، 8، 9، 11، 12، 13، 14، 15، 16، 17، 18، 19) تمثل نتيجة سالبة .

الاستنتاجات

بينت نتائج التحري عن جين الكبسولة *kps* في بكتريا *Acinetobacter baumannii* الى ان امتلاك بكتريا *A. baumannii* لجين الكبسولة كان بنسبة 15% فقط للعزلات قيد الدراسة.وتوصي الدراسة الى اجراء العديد من الدراسات لجينات الضراوة التي تمتلكها بكتريا *A.baumannii* ودراسة تأثيرها على ضراوة البكتريا وتحليل التسلسل التتابعي لهذه الجينات.

المصادر

1. Lambiase, A., Piazza, O., Rossano, F.,Pezzo, M. D.,Tufano, R. and Catania, M. R.(2012). Persistence carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in an Italian intensive care unit during a forty-six month study period. New Microbiological. 35: 199-206
2. Momtaz, H.; Seifati, S. and Tavakol, M. (2015). Determining the Prevalence and Detection of the Most Prevalent Virulence Genes in Acinetobacter baumannii Isolated from Hospital Infections. Int.J. Med. Lab. 2(2): 87-97.
3. Visca P1, Seifert H. and Towner K.J. (2011). Acinetobacter infection--an emerging threat to human health. IUBMB Life. Dec; 63(12):1048-54.
4. Wisplinghoff, H, and Seifert, H. (2014). Epidemiology and clinical features of Acinetobacter baumannii infections in humans. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 127 (11-12):447-57.
5. Magnet, S.; Courvalin, P .and Lambert T .(2001). Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in Acinetobacter baumannii strain BM4454 .Antimicrob. Agent Chemothe .45 :3375 – 3380.
6. Sevillano, E. Moreno, Funes, F. Espinoza, M. Bustamante, Z. and Gallego, L. (2016). First Detection of the bla oxa gene in multidrug resistant A. baumannii clinical isolated from Bolivia. J. inf. Deses count.
7. Dijkshoorn, L.; Brouwer, C.P.J.; Boggards, S.J.; Nemec, A .;Broek, P. J.V. and Nibbering, P. H. (2004) .The Synthetic N-Terminal Peptide of Human Lactoferrin, hLF (1-11), Is Highly Effective against Experimental Infection Caused by Multidrug-Resistant Acinetobacter baumannii . Antimicrob. Agent Chemothe. 48 (12) : 4919–492
8. Abdulla, A.A.; AL Thahab, A.A.; Abed, T.A.; Mahdi, R. K. and Fadhil, S.(2015).Screening of virulence factors in Acintobacter baumannii isolated from clinical samples. Int. J. Curr. Res and Acad. Rev. 3 (6): 128-134.
9. Boyce, J. D. and Alder, B. (2000) The capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of Pasteurella multicida M1404 (B:2). Infec.Immun.68 (6):3463 – 3468.

10. Braun, G. and Vidotto, M. (2004). Evaluation of Adherence, Hemagglutination, and Presence of Genes Codifying for Virulence Factors of Acinetobacter baumannii Causing Urinary Tract Infection. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 99(8): 839-844.

11. D0i, Y.; Yokoyama k.; Yaman k.; Shibata N.; Yagi ,T. and Arakawa Y.(2004) Plasmid-mediated 16 $ rRNA methylasein Serratia marcescens. Antimicrob. Agent Chemothe. 48(2):491-496.

12. Tomaras A.P., Dorsey C.W., Edelmann R.E. and Actis L.A. (2003). Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by Acinetobacter baumannii: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. Microbiology. 149: 3473-3484.

13. Braun, G. and Vidotto, M. (2004). Evaluation of Adherence, Hemagglutination, and Presence of Genes Codifying for Virulence Factors of Acinetobacter baumannii Causing Urinary Tract Infection. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro; 99(8): 839-. 844.

14. Baron, E. J.; Finegold, S. M. and Peterson, I. L. R. (2007). Bailey and Scott‹s Diagnostic Microbiology. 9th ed. Mosby Company. Missouri.

15. Johnson, J. R. and Stell, A.L. (2000). Extended virulence genotypes of Escherichia coli strains from patients with urosepsis in relation to phylogenic and host compromise. J. Infect. Dis.181: 261-272.

16. Sambrook, J. and Rusell, D. W. (2001). Molecular cloning a laboratory manual. Cold spring Harbor, NY: cold spring Harbor Laboratory press.

17. Sundar, S. K.; Kumari-Pushpa Rani, T.P.; Vijayalakshmi, B. and Murugan, M. (2014). Isolation and 16S rRNA Sequencing of Clinical Isolates of Acinetobacter baumanii. Int. Journal .Curr. Microbiol and App. Sci. 3 (5): 855-858.

18. Bergogne-Bérézin E. and Towner K.J.(1996). Acinetobacter spp. As nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin Microbiol Rev. 9(2):148-65.