الكشف عن جين الألجنيت *alg D* في بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa*

رنا مجاهد عبد الله و عباس فالح الأرناوطي

قسم علوم الحياة، كلية التربية ابن الهيثم للعلوم الصرفة، جامعة بغداد، العراق

استلام 24 يناير 2017م - قبول 20 يوليه 2017م

الملخص

تعد بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* من الممرضات الانتهازية التي تصيب الإنسان وتسبب العديد من الأمراض الخطرة التي قد تؤدي في بعض الأحيان إلى وفاة الشخص المصاب. تعد طبقة الألجنيت من عوامل الضراوة المهمة للبكتيريا والتي توفر الحماية لخلية البكتيريا.

جُمعت 100 عزلة سريرية تعود لبكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* من 2014/9/1 إلى 2014/11/1 من مصادر سريرية مختلفة من عدة مستشفيات في مدينة بغداد هي (مستشفى الطفل المركزي، والمختبرات التعليمية، ومستشفى الحروق/ مدينة الطب) وبعد التشخيص تم الحصول على 75 عزلة شملت: 28 عزلة التهاب الأذن الوسطى، 23 عزلة من الحروق، 10 عزلات من الجروح، 8 عزلات من التهاب المجاري البولية، 6 عزلات من الدم. وتم إجراء جميع التجارب في مختبرات الأحياء المجهرية والجزيئي في قسم علوم الحياة، كلية التربية للعلوم الصرفة ابن الهيثم، جامعة بغداد.

شُخصت العزلات باستعمال الأوساط الزرعية أكار المكونكي MacConkey agar، أكار السترمايد Cetrimide agar، أكار السيدوموناس Pseudomonas agar ، أكار الكروماجين CHROMagar. تم إجراء الفحوصات الكيموحيوية التي شملت فحص Oxidase test و Catalase test وللتشخيص النهائي استعمل نظام API20E . تم التحري عن جين الضراوة *alginate D* لبكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* باستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل.

أظهرت النتائج وجود 56 عزلة تعود لبكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* تمتلك الجين *alginate D* بنسبة 74.66 %، عند مقارنة الحزم المتضاعفة مع الدليل الحجمي وجد أن الحزم الناتجة ذات حجم 1310 زوج قاعدة، وكانت 21 عزلة بنسبة 75 % من حالات التهاب الأذن الوسطى و 14 عزلة بنسبة 60.86 % من حالات الحروق و 9 عزلة بنسبة 90 % من التهابات الجروح و 6 عزلات بنسبة 75 % من حالات التهاب المجاري البولية و 6 عزلات بنسبة 100 % من حالات الدم تمتلك هذا الجين.

الكلمات المفتاحية: تفاعل البلمرة المتسلسل، عوامل الضراوة.

المقدمة

تعد بكتيريا *P. aeruginosa* من الممرضات الانتهازية التي تصيب الإنسان وتسبب العديد من الأمراض الخطرة التي قد تؤدي في بعض الأحيان إلى وفاة الشخص المصاب (Overhage *et al.*, 2008)، (Bentzmann and Plesiat, 2011). وتعد بكتيريا *P. aeruginosa* أحد المسببات الرئيسة لأمراض تسمم الدم Bacteremia ذات الرئة Pneumonia والسحايا Meningitis في وحدات العناية المركزة للأطفال حديثي الولادة Neonatal Intensive Care Unit (Crivaro *et al.*, 2009) وكذلك إصابات الأذن Ear infections، التهاب شغاف القلب Endocarditis، إصابات العظام والمفاصل Bone and Joint infections، إصابات القناة البولية Urinary tract infections وإصابات المعدة والأمعاء Gastrointestinal infections فضلا عن أنها العامل الرئيس المسبب للإصابات المكتسبة في المستشفيات Nosocomial Infections ولا سيما في مراكز الحروق (Salimi *et al.*, 2010).

تمتلك هذه البكتيريا العديد من عوامل الضراوة، وهذه العوامل قسم منها إما مرتبط بالخلية Cell-associated Factor ومنها الأسواط Flagella، الزغب Pili، عديد السكريد الشحمي Lipopolysaccharide (LPS) ويسمى أيضا الذيفان الداخلي Endotoxin والألجنيت Alginate، أو عوامل تفرز خارج الخلية Secreted Extracellular Factor ومنها الإنزيم الحال للدم Hemolysin، البروتيز القاعدي Alkaline Protease، Elastase، الذيفان الخارجي Exotoxin ونظام إفراز النوع الثالث Type III Secretion system (Jimenez *et al.*, 2012). يشفر لإنتاج الألجنيت في هذه البكتيريا الجين *alg D* (Jain and Ohman, 2005) كما أن الإفراط في إنتاج الألجنيت والتحول إلى المظهر المخاطي هي إحدى العلامات لظهور التهاب الرئتين المزمن في مرضى التليف الكيسي Cystic Fibrosis (Qiu *et al.*, 2008)، وتعد طبقة الألجنيت

Alginate من عوامل الضراوة المهمة للبكتيريا وهي متعدد السكريات الخارجي Exopolysaccaride التي تمثل المادة المخاطية وتكون ذات لزوجة عالية وتوفر الحماية لخلية البكتيريا، وهي من العوامل الدفاعية للمضيف مثل خلايا البلعمة ومن مكونات نظام المتمم (Tan *et al*., 2014).

تعد طبقة الألجنيت المخاطية عنصرا أساسيا لتكوين الغشاء الحيوي Biofilm وهناك العديد من العوامل التي تحفز لإنتاج الألجنيت مثل الارتفاع في الضغط الأزموزي، قلة المواد الغذائية، قلة معدل النمو، وكذلك التعرض للمضادات الحيوية (Lamppa and Griswold, 2013) وهذه الطبقة تعد أحد أهم عوامل الضراوة التي لها دور في توفير الحماية اللازمة لخلية البكتيريا وعدم التعرض إلى خلايا البلعمة وغيرها من دفاعات المضيف (Rowe, 2013).

المواد وطرق العمل

عزل البكتيريا: تم جمع عينات من حالات مرضية مختلفة الجروح والحروق والتهاب المجاري البولية والتهاب الأذن الوسطى والدم للمدة من 2014/9/1 ولغاية 2014/11/1 من عدة مستشفيات في مدينة بغداد هي (مستشفى الطفل المركزي، المختبرات التعليمية، مستشفى الحروق/ مدينة الطب) وتم إجراء جميع التجارب في مختبرات الأحياء المجهرية والجزيئي في قسم علوم الحياة/ كلية التربية للعلوم الصرفة ابن الهيثم/ جامعة بغداد، ثم تم تشخيص البكتيريا باستخدام الأوساط الزرعية التقليدية MacConkey agar (تظهر العزلات غير مخمرة لسكر اللاكتوز) وBlood agar (تحلل الدم من نوع بيتا هيمولايسين) Citrimide agar (تظهر المستعمرات باللون الأصفر المخضر) و-Pseudo monas agar (قدرتها على النمو على هذا الوسط لأنه خاص بهذه البكتيريا) ووسط Chroma-gen agar (ظهرت المستعمرات باللون الأخضر أو الكريمي المخضر) واستعملت الفحوصات البايوكيميائية Oxidase (موجبة للفحص) وCatalase (موجبة للفحص) واستعمال API 20 E للتشخيص النهائي (Baron *et al*., 2007) ، وتم حفظ العزلات على وسط الأكار المغذي الصلب بدرجة حرارة 4 م° في مختبرات الأحياء المجهرية والجزيئي في قسم علوم الحياة/ كلية التربية للعلوم الصرفة ابن الهيثم/ جامعة بغداد وجددت هذه العزلات شهريا، وتم إجراء جميع الفحوصات والتحليلات من قبل الباحثين.

عزل DNA : تم استخلاص DNA باستعمال عدة خاصة للاستخلاص وحسب تعليمات الشركة المصنعة (Geneaid Biotech kit system, UK).

تحضير محاليل البوادئ: حضرت محاليل البوادئ الخزينة حسب تعليمات شركة (Can- Alph DNA ada) المجهزة لها والمذكورة في الجدول (1) باستعمال ماء مقطر لا أيوني معقم للحصول على تركيز 100 بيكومول / مايكروليتر.

جدول (1): حجم وتتابع البادئ المستعمل في الكشف عن جين الألجنيت لبكتيريا *P. aeruginosa*

اسم الجين		تتابع البادئ (5′–3′) Primer sequence	الناتج (bp)	المصدر
algD	F	ATGCGAATCAGCATCTTTGGT	1310	Lanotte *et al*., (2004)
	R	CTACCAGCAGATGCCCTCGGC		

ولقد حضر محلول كل بادئ بشكل منفصل بتركيز 10 بيكومول/ مايكروليتر وذلك بأخذ 10 مايكروليتر من محلول كل بادئ خزين Stock وإضافة 90 مايكروليتر من ماء مقطر لا أيوني ومزج بوساطة المازج Vortex جيدا وحفظ مع المحاليل الخزينة Stock للبوادئ في درجة حرارة – 20 م° مع مراعاة مزج محلول البادئ بعد إخراجه من الثلج باستعمال المازج Vortex لمجانسته قبل الاستعمال.

تم تحضير خليط تفاعل PCR للجين (*alg D*) وتكون من GO Taq Green Master Mix والمجهز من قبل شركة Bioneer (Korea)، 5 مايكروليتر من template DNA المستخلص، 1.5 مايكروليتر من F-Primer، 1.5 مايكروليتر من

R-Primer و12 مايكروليتر من ماء مقطر لا أيوني معقم والمجهز من قبل شركة Bioneer (Korea)، بعد ذلك مزجت محتويات أنابيب PCR جيدًا باستعمال المازج Vortex ثم وضعت في جهاز PCR وبرمج الجهاز.

أما خطوات التضاعف للتحري عن جين *alg D* حسب ما ذكر في (Mitov *et al*., 2010)؛ حيث تم التحوير في البرنامج كما هو موضح في جدول (2).

جدول (2): خطوات التضاعف للتحري عن جين *alg D* لبكتيريا *P. aeruginosa*.

الخطوة	البرنامج	
1	دورة واحدة فقط لمدة 5 دقائق عند درجة حرارة 94م° للمسخ الأولي DNA القالب.	
2	30 دورة تضمنت:	
	A	30 ثانية عند درجة حرارة 94م° لمسخ DNA القالب template DNA.
	B	45 ثانية عند درجة حرارة 60م° لكي يتم ارتباط البوادئ مع DNA القالب.
	C	45 ثانية عند درجة حرارة 72م° ليتم استطالة البوادئ المرتبطة.
3	دورة واحدة فقط لمدة 7 دقيقة وبدرجة حرارة 72م° للاستطالة النهائية لشريط DNA المتضاعف.	

وبعد ذلك نقل 5 مايكروليتر من ناتج تضاعف الجين للترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز المحضر بتركيز 2 % الحاوي على 5 مايكروليتر من صبغة Bio Basic INC Eithidium bromide (Canada) باستعمال DNA ladder (100) زوج قاعدة وبفرق جهد 50 فولت لمدة ساعتين وتم التصوير باستخدام UV light Optima(Japan) (Sambrook and Rusell,2001).

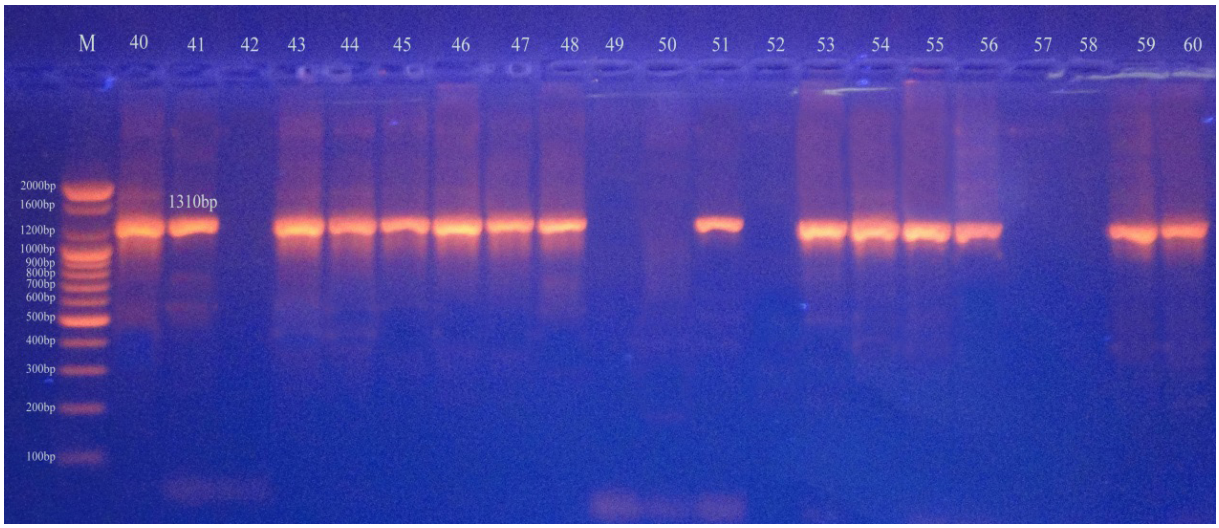
النتائج والمناقشة

أظهرت النتائج وجود 56 عزلة تعود لبكتيريا *P. aeruginosa* تمتلك الجين *alg D* بنسبة 74.66%، عند مقارنة الحزم المتضاعفة مع الدليل الحجمي وجد أن الحزم الناتجة ذات حجم 1310 زوج قاعدة وكانت 21 عزلة (75%) من حالات التهاب الأذن الوسطى و 14 عزلة بنسبة (60.86%) من حالات الحروق و 9 عزلة بنسبة (90%) من التهابات الجروح و 6 عزلات بنسبة (75%) من حالات التهاب المجاري البولية و 6 عزلات بنسبة (100%) من حالات الدم تمتلك هذا الجين كما في الجدول (3) وفي الشكل (1).

جدول (3): عدد ونسب جين *alg D* في بكتيريا *P. aeruginosa*

ت	المصدر Sources	عدد العزلات التي تمتلك جين *alg D*	النسبة المئوية للعزلات التي تمتلك جين *alg D* (%)
1	التهاب الأذن الوسطى Otitis media	21	(75)
2	حروق Burn	14	(60.86)
3	جروح Wound	9	(90)
4	التهاب المجاري البولية UTI	6	(75)
5	دم Blood	6	(100)
	المجموع Total	56	(74.66)

وجاءت هذه النتيجة تتوافق مع ما حصل عليه Wolska and Szweda (2009) إذ وجدا أن العزلات السريرية لبكتيريا *P. aeruginosa* كانت تملك الجين *alg D* بنسبة 69.2% وكذلك تتفق نتيجة الدراسة الحالية مع ما حصلت عليه Garallah (2015)؛ إذ وجدت أن 65.38% من عزلات هذه البكتيريا كانت تملك الجين *alg* D.



الشكل (1): الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل PCR لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* وباستعمال البادئ النوعي للجين *alg D* (1310 زوج قاعدة) على هلام الأكاروز بتركيز 2 % وفرق جهد 50 فولت / لمدة ساعتين
M يمثل الدليل الحجمي 100 زوج قاعدة. المسارات (40، 41، 43، 44، 45، 46، 47، 48، 51، 53، 54، 55، 56، 59 ،60) تمثل ناتج تضخيم الجين *alg D* لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa*. المسارات (42، 49، 50، 52، 57، 58) تمثل العزلات التي لاتمتلك جين *alg D*.

تعد الطبقة (الألجنيت) عنصرا أساسيا لتكوين الغشاء الحيوي Biofilm وبذلك توفر حماية عند التعرض للمضادات الحيوية (Lamppa and Griswold, 2013)، ويشفر الجين *alg D* لإنتاج طبقة الألجنيت Alginate التي تمثل عديد السكريات الخارجي Exopolysaccharide وتكون هذه الطبقة ذات لزوجة عالية وتوفر حماية للخلية البكتيرية من العوامل الدفاعية للمضيف مثل خلايا البلعمة ومن مكونات نظام المتمم (Tan *et al*., 2014).

المراجع

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

Bentzmann, S., and Plesiat, P. 2011. The *Pseudomonas aeruginosa* opportunistic pathogen and human infections. J. Applied Microbiology. 13(7): 1655-1665.

Crivaro, V., Popolo, A., Alessandro, C., Lambiase, A., Resta, M., Borriello, T., Scarcella, A., Triassi, M., and Zarrilli, R. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal intensive care unit: Molecular epidemiology and infection control measures. BMC Infection Disease. 9(70): 1-7.

Garallah, E.T. 2015. Molecular analysis of some virulence genes of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis and non-cystic fibrosis sources. M.Sc. Thesis. College of Science. AL-Mustansiryia University.

Jain, S., and Ohman, D.E. 2005. Role of an alginate lyase for alginate transport in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. Amer. Soci. Microb. 73(10): 6429-6436.

Jimenez, P.N., Koch, G., Thompson, J.A., Xavier, K.B., Cool, R.H., and Quax, W.J. 2012. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. JASM. 11: 46-65.

Lamppa, J.W., and Griswold, K.E. 2013. Alginate lyase exhibits catalysis independent biofilm dispersion and antibiotic synergy. Antimicrob Agent Chemother. 57(1): 137-145.

Lanotte, P., Watt, S., Mereghetti, L., Dartiguelongue, N., Rastegar-Lari, A., Goudeau, A., and Quentin, R. 2004. Genetic features of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients compared with those of isolates from others origins. J. Medical Microbiology. 53: 73-81.

Mitov, I., Strateva, T., and Markova, B. 2010. Prevalence of virulence genes among Bulgarian nosocomial and cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Brazilian J. Microbiology. 41: 588-595.

Sambrook, J., and Rusell, D. W. 2001. Molecular Cloning, a Laboratory Manual. Cold spring Harbor Laboratory press, Cold spring Harbor, NY.

Tan, J., Rouse, S.L., Li, D., Pye, V.E., Vogeley, L., Brinth, A.R., Arnaout, T., Whitney, J.C., Howell, P.L., Sansom, M.S.P., and Caffrey, M. 2014. A conformational landscape for alginate secretion across the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biological. 70(8): 2054-2068.

Wolska, K., and Szweda, P. 2009. Genetic features of clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains. J. Microbiology. 58(3): 255-260.

Overhage, J., Bains, M., Brazas, M.D., and Hancock, R.E. 2008. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factor and antibiotic resistance. J. Bacteriology. 190(8): 2671-2679.

Qiu, D., Eisinger, V. M., Head, N.E., Pier, G.B., and Yu, H.D. 2008. Cipxp proteases positively regulate alginate overexpression and mucoid conversion in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Microbiology. 154(7): 2119-2130.

Rowe, W. 2013. The role of alginate in the inhibition of macrophage phagocytosis of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. Medicine Health Sciences Commons. 1: 1-3.

Salimi, H., Yakhchal, B., Owlia, P., and Lari, A. R. 2010. Molecular epidemiology and drug susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from burn patients. J. Labmedicine. 41(9): 540-550.

Detection of Alginate *alg D* Gene of *Pseudomonas aeruginosa*

Rana M. Abdullah Al-Shwaikh and Abbas Falih Al-arnawtee

Department of Biology, College of Education Ibn-Al Haitham, University of Baghdad.

Received 24 january 2017 - Accepted 20 july 2017

ABSTRACT:

Pseudomonas aeruginosa are opportunistic pathogens that infect humans causing many diseases, which may lead to the death of a person. Alginate are important virulence factors of the bacterium, which provides protection to the bacteria cell layer.

One hundred isolates of *Pseudomonas aeruginosa* were collected during the period between 1/9/2014 to 1/11/2014 from Central Teaching Hospital of Pediatric, Medical city, Department of teaching laboratories, and Burns Hospital /Medical City, in Baghdad, Iraq. After identification, seventy five isolates were confirmed to be *P. aeruginosa* including 28 isolates from otitis media, 23 isolates from burn infections, 10 isolates from wound infections, 8 isolates from urinary tract infections and 6 isolates from blood. Lab work was performed in the laboratories of Molecular and Microbiology in Department of Biology/ College of Education Ibn- Al Haitham/ University of Baghdad.

The isolates were identified by culturing on MacConkey agar, Cetrimide agar, Pseudomonas agar, and CHROM agar then identified by performing biochemical tests including oxidase test, catalase test, and were further identified using an API20E system.

Genotypic detection for virulence genes *alginate D* of *Pseudomonas aeruginosa* was performed using PCR.

The result revealed that the *alginate D* gene was present in 56 isolates (74.66 %) of *Pseudomonas aeruginosa*. The gel electrophoresis showed that the size of *alginate D* gene was 1310 bp.

Seventy five isolates of *Pseudomonas aeruginosa* had *alginate D* including 21 isolates from otitis media (75%), 14 isolates from burn infections (60.86%), 9 isolates from wound infections (90%), 6 isolates from urinary tract infections (75%), and 6 isolates from blood (100%).

Key Words: PCR, Virulence factor.