P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703
2015 ,(9), (3) :66-71

مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة (JUAPS)

Open Access

تشخيص المكورات العنقودية الذهبية جينياً اعتماداً على الجين *nuc* .

مشتاق طالب صالح*   احمد محمد تركي**   ميادة عبدالله شيحان **

*جامعة الانبار – كلية الصيدلة

**جامعة الانبار – كلية العلوم

معلومات البحث:

تاريخ التسليم: ٢٠١٣/٠٠/٠٠
تاريخ القبول: ٢٠١٤/٥/٦
تاريخ النشر: / / ٢٠٢٢

DOI: 10.37652/juaps.2015.127590

الكلمات المفتاحية:

تشخيص ،
مكورات عنقودية ،
وراثة ،
nuc gene
.

الخلاصة:

تم فحص العترات المعزولة من الجروح من مستشفى الرمادي العام التعليمي مظهريا باستخدام الطرق التقليدية وجينيا باستخدام تفاعل الكوثرة PCR للكشف عن جين *nuc* الخاص ببكتريا المكورات العنقودية الذهبية والمسؤول عن انتاج انزيم *nuc*lease thermostable باستخدام قاعدات البوادئ المصنعة بحجم ٢١ و ٢٤ قاعدة على التوالي ، ولقد ضخم الجين ذو الحجم ٢٧٠ زوج قاعدي المستخلص من الجينوم البكتيري بتفاعل الكوثرة وان نواتج هذا التفاعل رحلت على هلام الاكاروز بعملية الترحيل الكهربائي . ومن خلال نتائج هذه الدراسة تم عزل المكورات العنقودية الذهبية بنسبة ٥٧,٥% (١٦٧/٩٦) بالاعتماد على الطرق التقليدية وكانت جميع هذه العزلات ١٠٠% موجبة لـ جين *nuc* . ان استخدام تفاعل البلمرة لتضخيم جين *nuc* يعتبر مؤشر قوي للتشخيص السريع لالتهابات المكورات العنقودية الذهبية بطريقة مباشرة في العينات السريرية وحتى دون الحاجة الى استخدام الطريق التقليدية المعتاد عليها في مختبرات الوحدات الصحية.

المقدمة.

المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* كثيراً ما تستوطن الجلد والأغشية المخاطية mucus membrane وهي واحدة من اغلب المسببات المرضية المنتشرة عالمياً خصوصاً الالتهابات بعد العمليات الجراحية [1] وتتراوح هذه الأمراض من التهابات الجلد البسيطة الى الامراض التي تهدد الحياة مثل ذات الرئة pneumonia وتجرثم وتسمم الدم Septicemia and Bacterimia وتمتلك هذه البكتريا قدرة عالية على اكتساب محددات المقاومة للمضادات الحيوية خصوصاً بعد دخول المضادات الحيوية الجديدة في مجال الاستخدام الطبي ولان المكورات العنقودية الذهبية لها إمكانية مرضية عالية من بين أنواع المكورات العنقودية فان اكتساب محددات المقاومة في هذه البكتريا يسبب تحدي كبير للمعالجة والسيطرة على الأمراض التي تسببها هذه البكتريا [2] .

سلالات المكورات العنقودية الذهبية تنتج انزيم*nuc*lease خارج الخلايا ومقاوم للحرارة extracellular thermostable *nuc*lease (Thermo*nuc*leaseTNase) [3] وهذا الانزيم TNase عبارة عن بروتين ذي وزن جزيئي 17,000 Da [4] ويحطم كلا الحامضين النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين DNA والحامض النووي الرايبوزي RNA وفعاليته الانزيمية تقاوم حتى درجة حرارة ١٠٠ مْ لمدة ساعة [5] وتم ايضاً دراسة الفعالية الانزيمية لهذا الانزيم لتحليل الاحماض النووية في العديد من الاختبارات المختبرية كإحدى خطوات تشخيص المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* لكن هذا الاختبار غير خاص بهذه البكتريا[6, 7] إلا أن التحديد الجزيئي Molecular detection للجين *nuc* gne المسؤول عن انتاج TNase يكون خاصspecific ببكتريا *Staphylococcus aureus* [8] واستخدم للكشف عن الامراض الناتجة عن الاصابة بهذه البكتريا حتى عند تراكيز واطئة لها ولمنتجاتها في العينات السريرية [9, 10 , 11]. لذلك استخدمت طريقة PCR لتضخيم الجين *nuc* gene

* Corresponding author at: University of Anbar - College of Pharmacy
E-mail address:

باستخدام البوادئ الخاصة به للتشخيص والكشف السريع والدقيق من المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* [12]

المواد وطرق العمل

جمع العينات Sample Collection

أستخدمت المسحات القطنية الجاهزة المجهزة بوسط تناقل Transport medium المصنعة من شركة Greiner Germany في جمع نماذج الجروح من ١٦٧ مريضاً راقدين ومراجعين للعيادات الإستشارية في مستشفى الرمادي العام ولمختلف الفئات العمرية ولكلا الجنسين للفترة من شباط ولغاية تموز ٢٠١٣ وتم زرع العينات بأقل من نصف ساعة على اكار الدم وبطريقة التخطيط المباشر وحضنت في ٣٧° م لمدة ٢٤ ساعة وبعد فترة الحضن تم إختبار بعض المستعمرات النامية وأجريت لها عملية التنقية على وسط Mannitol Salt Agar واكار الدم وأكار الماكونكي لدراسة صفاتها الزرعية من حيث حجمها ولونها وارتفاعها وغيرها من الصفات الزرعية الأخرى .

تشخيص العزلات :

تم تشخيص العزلات بالإعتماد على الفحوصات البكتريولوجية والكيموحيوية إعتماداً على المصادر العلمية المتبعة لتشخيص البكتريا [13, 14] .

خطوات عزل الـ DNA

تم استخلاص الـ DNA الكروموسومي بطريقة المسخ القاعدي وباستخدام promega kit .

التقدير الكمي للدنا DNA quantitation

حضرت نماذج الـ DNA من البكتريا قيد الدراسة *Staphylococcus aureus* وقدرت كمياً بأخذ (٢٠) مايكروليتر من الدنا وأضيف له ٩٨٠ مايكروليتر من TE buffer ثم مزجت جيداً وقيست الأمتصاصية عند الطول الموجي باستخدام جهاز ألمطياف ألضوئي Spectrophotometer واستخدام TE buffer كمحلول سيطرة (Blank) وتقدر نقاوة الدنا من حاصل قسمة قراءة الامتصاصية عند طول موجي ٢٦٠ نانوميتر على قراءة الامتصاصية على طول موجي ٢٨٠ نانوميتر [15] . وحفظت جميع النماذج بدرجة حرارة –٢٠° م لحين الاستخدام .

تركيز الـ DNA(DNA concentration) مايكروغرام/ مايكروليتر = (القراءة عند الكثافة الضوئية بطول موجي ٢٦٠) × الكل/ حجم النموذج × الثابت (٥٠ مايكروغرام/١٠٠٠ مايكروليتر) والناتج يقدر بواسطة (التركيز × الحجم الكلي) .

خطوات تفاعل الكوثرة Polymerase Chain Reaction الخاصة بـ الجين المراد تحديده .

الجدول التالي يوضح خطوات تفاعل الكوثرة الخاصة بالـ جين *nuc* .

جدول رقم (١) يوضح خطوات تفاعل الكوثرة (PCR) الخاصة بتضخيم الجين *nuc* gene .

مسخ بدائي Initial Denaturation	١٠ دقيقة	٩٤ م°	٣٠ cycles دورة
مسخ Denaturation	٣٠ ثانية	٩٤ م°	
اتحاد والتحام Annealing	١ دقيقة	٥٠ م°	
استطالة Extension	١:٣٠ ثانية	٧٢ م°	
استطالة نهائية Final Extension	١٠ دقيقة	٧٢ م°	

تتابع البادئ الخاص بـ الجين Sequences of *nuc* gene Primer

nuc F 5' GCGATTGATGGTGATACGGTT 3'
270 bp
nuc R
5'AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC 3'

الترحيل الكهربائي على هلام الأگاروز

يتم الترحيل الكهربائي للدنا على هلام الأگاروز على ألنحو ألتالي :

١_ تحضير هلام الأگاروز بتركيز ١٪ وذلك للكشف عن عينات الدنا الذي تم استخلاصه وللحصول على التركيز المذكور آنفاً أضيف (١غم) من الأگاروز في (١٠٠) مل من محلول TBE buffer بقوة (1X) (يحضر من مزج ١٠مل من 10XTBE مع ٩٠ مل من الماء المقطر وتمت ألإذابة بدرجة الغليان عن طريق وضعه بجهاز Microwave ثم ترك ليبرد إلى درجة حرارة (٤٠_٥٠) م° وأضيفت صبغة Red safe بتركيز (٥) مايكروليتر لكل (

١٠٠) مل من الأگاروز مع التحريك بلطف حتى يتجانس انتشار هذه الصفة في الهلام .

٢- حملت عينات الدنا وذلك بمزج (١٠) مايكروليتر من كل عينة من عينات الدنا المراد تحميله مع (٢) مايكروليتر من محلول التحميل وقد خصصت أحدى الحفر لاضافة الدليل الحجمي مع محلول التحميل بحجم كلي (١٢) مايكروليتر . أما الحفر الأخرى فقد خصصت لإضافة عينات الدنا مع محلول التحميل وبعد إن ملئت جميع الحفر المطلوبة يمرر التيار الكهربائي بفرق جهد (٥) فولت لكل (٢٠) سم من حوض الترحيل لمدة من ٣٠_٦٠ دقيقة ويكون اتجاه الترحيل للحزم من القطب السالب إلى القطب الموجب.

النتائج والمناقشة .

العزل والتشخيص isolation and identification

تم تشخيص بكتريا المكورات العنقودية الذهبية في (١٦٧) عينة من عينات الجروح جمعت من المرضى المشمولين بالدراسة في مستشفى الرمادي العام واعتمد تشخيص البكتريا اعلاه في هذه العينات على الصفات الزرعية لمستعمراتها النامية على وسط mannitole salt agar واكار الدم blood agar. واظهر الفحص المجهري والتصبيغ بصبغة كرام انها مكورات موجبة لصبغة كرام وتنتظم على هيئة تجمعات وعناقيد العنب grape like shape وغير مكونة للابواغ وغير متحركة باختبار فحص الحركة .

أما نتائج الاختبارات الكيموحيوية للعزلات فكانت كما هو مبين في الجدول (٢).

جدول رقم (٢) يبين نتائج الاختبارات الكيموحيوية للعزلات قيد الدراسة.

MSA Growing on	Haemolysis	Thermonuclease	Motility	Coagulase	Catalase	Oxidase	Gram – staining
1	α -42%	+	–	+	+	+	+
	β-58%						

+:جميع العزلات اعطت نتيجة موجبة

–:جميع العزلات اعطت نتيجة سالبة

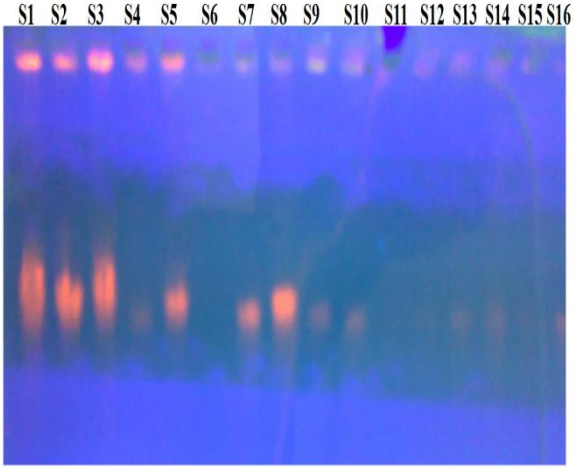
MSA: Mannitol salt agar –

إن إنتاج أنزيم *nuc*lease يعتبر مؤشر قوي potent indicator للمكورات العنقودية الذهبية المرضية *Staphylococcus aureus* على مدى العقود الاخيرة [16] وان جميع عزلات *Staphylococcus aureus* قيد الدراسة ١٠٠% كانت منتجة له وان فعالية هذا الانزيم thermo*nuc*lease في العزلات السريرية تكون بسبب تكسر او تحطم DNA الموجود في الوسط الزرعي عن طريق انتاج هذا الانزيم الذي له القدرة على تحطيم DNA [17].

استخلاص الحامض النووي منقوص الاوكسجين الـ DNA.

ترحيل الحامض النووي قبل اجراء تفاعل الكوثرة (Pre-PCR).

تم عزل الـ DNA من عزلات المكورات العنقودية الذهبية قيد الدراسة باستخدام promega kit وبعد قياس تركيز ونقاوة الحامض النووي باستخدام جهاز المطياف الضوئي الخاص Specctrophotometer ومن ثم تطبيق المعادلة الخاصة بذلك ثم تم ترحيل الحامض النووي على هلام الاكاروز وكانت النتيجة كما في الشكل(١).



شكل رقم (١) يوضح نتيجة الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز (0.7%) بصبغة بروميد الاثيديوم قبل اجراء تفاعل الكوثرة Pre –PCR لجينوم المكورات العنقودية الذهبية.

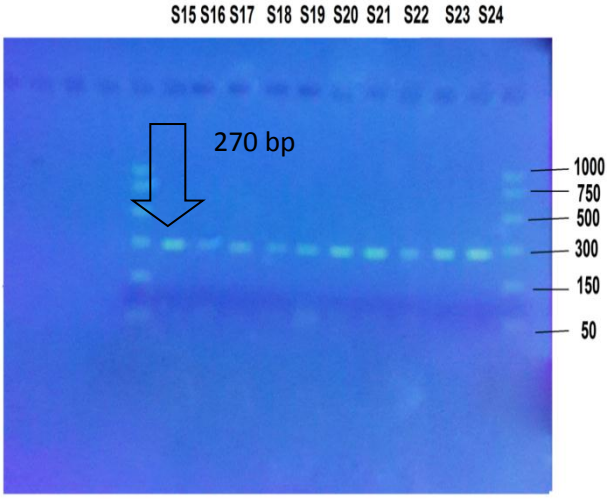
تحديد الجين *nuc gene* لتشخيص المكورات العنقودية الذهبية جينيا.

أن التحديد الجزيئي Molecular detection للجين *nuc* gne المسؤول عن إنتاج TNase يكون خاص specific ببكتريا *Staphylococcus aureus* [8] واستخدم للكشف عن الامراض الناتجة عن الاصابة بهذه البكتريا حتى عند تراكيز واطئة لها ولمنتجاتها

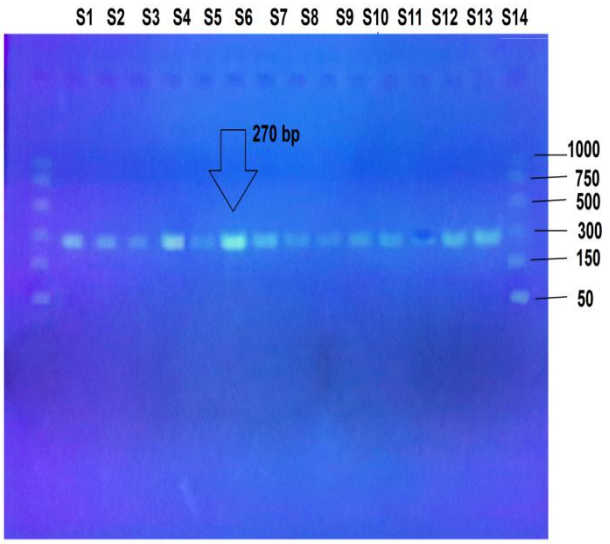
في العينات السريرية [9, 10, 11] . لذلك استخدمت طريقةPCR لتضخيم الجين *nuc* gene باستخدام البواديء الخاصة به للتشخيص والكشف السريع والدقيق من المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* [12].

في هذه الدراسة ومن خلال تفاعل الكوثرة PCR وباستخدام البوادئ الخاصة بالجين *nuc* gene تم تحديد هذا الجين في ١٠٠% من عزلات المكورات العنقودية الذهبية المشخصة بالطرق التقليدية الخاصة بتشخيصها حيث ظهرت حزم هذا الجين واضحة ذات الحجم ٢٧٠ زوج قاعدي بعد إجراء التضخيم لهذا الجين والترحيل الكهربائي والفحص تحت الاشعة الفوق بنفسجية كما هو واضح في الشكل (٢) و(٣) .وفي دراسة اخرى تم تضخيم هذا الجين *nuc* gene في جميع عزلات المكورات العنقودية الذهبية التي تم تشخيصها بالطرق التقليدية ولم يتم تشخيصه في أنواع اخرى من البكتريا لذلك يمكن استغلال هذه الطريقة لتشخيص المكورات العنقودية الذهبية والاستغناء عن الطرق الأخرى وذلك لان هذا الجين خاص Specific بهذا النوع من البكتريا [18] وفي دراسات أخرى كانت تعتمد على تضخيم الجينات المسؤولة عن مقاومة المكورات العنقودية الذهبية للمثيسيلين وعلى الجينات المشفرة للسموم toxins في هذه البكتريا أما في الوقت الحاضر يعتمد على تضخيم الجين *nuc* gene لتشخيص المكورات العنقودية الذهبية وتفريقها عن الانواع الاخرى [19] إن الجمع بين تفاعل الكوثرة لتضخيم الجين *nuc* gene وتضخيم الجينات المشفرة للصفات المظهرية Phenotypic characteristic مهمة لتشخيص المكورات العنقودية الذهبية ليس فقط في العينات السريرية لتشخيص الامراض وإنما أيضا للكشف عن تلوث الأغذية وفي العينات البحثية كالتربة والمياه [12] وفي دراسة اجريت في المملكة العربية السعودية تم تضخيم الجين *nuc* gene في ١٠٠% من عزلات المكورات العنقودية الذهبية[20] .

وقد استخدمت الطرق الجزيئية لتحديد الجينات الخاصة بانتاج الانزيمات مثل الجين coa gene المشفر لانتاج انزيم coagulase وجين *nuc* gene المشفر لانتاج انزيم thermonuclase للتفريق بين *S. aureus* و *S. intermedius* و *S. Hyicus* [21] .



شكل (٢) يوضح نتيجة الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز(٢%) بصبغة Red safe حيث يلاحظ الحزم المضخمة للجين *nuc* gene الخاص بالمكورات العنقودية الذهبية حيث تم تحديد الجين في جميع العزلات (S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9, S10, S11, S12, S12, S13, S14) باستخدام الدليل الحجمي bench top على اليمين واليسار كمعلم لتعيين حجم الجين .



شكل (٣) يوضح نتيجة الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز(٢%) بصبغة Red safe حيث يلاحظ الحزم المضخمة للجين nuc gene الخاص بالمكورات العنقودية الذهبية حيث تم تحديد الجين في جميع العزلات (S15, S16, S17, S18, S19, S20, S21, S22, S23, S2) باستخدام الدليل الحجمي bench top على اليمين واليسار كمعلم لتعيين حجم الجين .

المصادر

1- Shorr AF(2007) .Epidemiology of Staphylococcal resistance .Clinical infection diseases .45(3):S171 _ S176.

2- Chamber HF , DeLeo FR (2009). Wavesof resistance *Staphylococcus aureus*in the Antibiotic Era. Nature Reviews Microbiology .7(9):629_641.

3- Madison BM and Baselski VS (1983) . Rapid identification of *Staphylococcus aureus* in blood culture by thermo*nuc*lease testing .J. Clin . Microbiol .18:722_724.

4- Tucker PW, Hazen EE, Cotton FA (1978). Staphylococcal *nuc*lease reviewed : A prototypic study in contemporary enzymology .Isolation , physical and enzymatic properties.Mol.Cell . Bi ochem .22: 67_77.

5- Kovacevic S, Veal H, Hiung M, Miller J (1985). Secretion of staphylococcal *nuc*lease by Bacillus subtilis . J.Bactriol.162:521-528.

6- Gudding R(1983).Differentiation of Staphylococci on basis of *nuc*lease properties.J.Clin.Microbiol . 18:1098_1101.

7- Lachica RVF , Genigeorgis C, Hoeprich PD (1971). Metachromatic agar diffusion methods for detecting Staphylococcal *nuc*lease activity .J.Appl.Microbiol.21:585-587.

8- Thiele D (1990). The technique of polymerase chain reaction -3 new diagnostic tool in microbiology and other scientific fields (Review) . Zentralbl. Bacteriol .Parasitenkd.Hyg.Abt.1 Orig .273:434_454.

9- Hay PE, Clarke FR, Taylor_Ribison D, Goldmeier D (1990).Detection of treponemal DNA in the CSF of patients with syphilis and HIV infection using polymerase chain reaction .Genitourin .Med.66:428_432.

10-Valentine JL, Arthur RR. Mobely HL, Dick JD (1991).Detection of Helicobacter pylori by using the polymerase chain reaction . J.Clin .Micribiol .29:689_695.

11-DeWit MY, Faber WR, Krieg SR, Douglas SB, Lucas N, Montreewasuwat N, Pattyn SR, Hussain R, Ponnighaus JM, Hartskeert RA, Klatser PR(1991).Application of a polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* in skin tissues.J.Clin.Microbiol.29:906_910.

12-Odd GM, Kjetill A , Johan AM (1992). Detection of *Staphylococcus aureus* by using the polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene .J.of clinical Microbiology .30(7):1654_1660.

13-Baron ET, Peterson LR, Finegold SM. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology .19th ed .Toronto : Mosby company 1994: 352-385.

14-Holt JG, Krieg NR, Sneath PH, Staley Jt, Williams ST.Berges's manual of determination bacteriology .9th ed. USA 1994.

15-Samborook J, Fritch EF , Maniatis T (1989) .Molecular cloning a laboratory Mnual (2nd ed) . Cold soring , Harbor Laboratory Press .New York .

16-DiSalvo JW(1958). Deoxyribonuclease and coagulase activity of micrococci.Med Tech Bull.9:191-196.

17-Lachica RVF , Genigeorgis C, Hoeprich PD(1971). Metachromatic agar diffusion methods for detecting Staphylococcal nuclease activity .J.Appl.Microbiol.21:585-587

18-Tokue Y, Shoji S, Satoh K, Watanabe A, Motomiya M(1992).Detection of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) using polymerase chain reaction amplification .Tohoku J.Exp.Med.163:31-37.

19-Wilson IG, Cooper JE, Gilmour A(1991). Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus*in dried skimmed milk : Use of polymerase chain reaction amplification and detection of Staphylococcal enterotoxin genes *entB*, *entC1* and the thermonuclease gene *nuc* .Appl.Environ.Microbiol .57: 1793-1789.

20-Ibab M and Atef S(2008). Molecular characteristic of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* removed from outpatient clinic in Riyadh Saudi Arabia. Saudi .Med. J .30(5): 611-617.

21-Eliezer AG, Jorge AS, Marcia RP, Wladimir PD .(2005). Differentiation between *Staphylococcus aureus* , *S intermedius* and *S hyicus* Using phenotypical tests and PCR.Alim .Nutr.Araraquara.16:99-103.

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2015 ,(9), (3) :66-71

Genetic identification for Staphylococcus aureus by using nuc gene

Mushtaq T. Salih Ahmed M. Turkey Mayada A. Shihan

E.mail:

Abstract

To examine the recovered strains phenotypically by conventional methods and genotypically by using synthetic oligo*nuc*leotides of 21 and 24 bases in polymerase chain reaction to amplify a sequence of ***nuc*** gene , which encoded thermostable *nuc*lease of *Staphylococcus aureus.* A DNA fragment of approximately 270 bp was amplified from isolated DNA, PCR products was detected by agarose gel electrophoresis. Our results showed that 100% of *Staphylococcus aureus* were positive to ***nuc*** gene .The PCR for amplification of ***nuc*** gene has potential for rapid diagnosis of S. aureus infections by direct testing of clinical specimens .