P- ISSN 1991-8941 E-ISSN 2706-6703 (JUAPS) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2018,12 (1) :18-30

التحري الجزيئي لبعض جينات الضراوة لبكتريا *Staphylococcus aureus* , المعزولة من النساء المصابات بالتهاب المهبل البكتيري *Pseudomonas aeruginosa*

ورود مطلب فرحان هناء عبد اللطيف ياسين
قسم علوم الحياة – كلية التربية للبنات– جامعة الانبار

معلومات البحث:
تاريخ التسليم: 2017/12/18
تاريخ القبول: 2018/4/23
تاريخ النشر: 27/ 11 / 2018

DOI: 10.37652/juaps.2022.171457

الكلمات المفتاحية:
مسحة مهبلية،
البكتريولوجية،
اعراض سريرية،
الأختبارات المجهرية والكيموحيوية.

الخلاصة:

تضمنت الدراسة جمع 250 مسحة مهبلية من مريضات يشكين اعراض سريرية لالتهاب المهبل البكتيري والمراجعات لمستشفى النسائية والاطفال في مدينة الرمادي، وبأعمار تتراوح بين 17–45 سنة للتحري عن الانواع البكتيرية السالبة والموجبة لصبغة كرام الموجودة في المهبل، ولتحديد عوامل ضراوتها مظهريا وجزيئيا. عند زرع المسحات المهبلية وجد ان 86 عينة اعطت نموا بكتيريا وبنسبة 34.4%، بينما 164 عينة وبنسبة 65.6% كانت سالبة (لم تعطي النمو بكتيريا)، كما خضعت العزلات النامية للفحوصات البكتريولوجية والكيموحيوية ووجد أن عدد العزلات البكتيرية الموجبة لصبغة كرام كانت 48 عزلة وبنسبة 55.814%، منها 18 عزلة وبنسبة 20.930% تحمل صفات بكتيريا *Staphylococcus epidermidis,* , اما بكتريا *Staphylococcus aureus* كان عددها 9 عزلات وبنسبة 10.465%، وبكتريا *pneumoniae Streptococcus* كان عددها 7 عزلات وبنسبة 8.140% وكذلك بكتريا *Staphylococcus saprophyticus* بلغ عددها 6 عزلات وبنسبة 6.977 %، وبكتريا *Streptococcus pyogenes* كان عددها 4 عزلات وبنسبة 4.651% وكان عدد بكتريا *Bacillus subtilis* ثلاثة فقط وبنسبة 3.488%، وبكتريا *Streptococcus viridans* عزلة واحدة فقط وبنسبة 1.163%.

أما العزلات البكتيرية السالبة صبغة كرام فقد كان عددها 38 عزلة وبنسبة 44.186% فقد كانت الأختبارات المجهرية والكيموحيوية تحمل صفات بكتريا *Escherichia coli* بواقع 15 عزلة وبنسبة 17.442% و14 عزلة من بكتريا *Klebsiella pneumoniae* وبنسبة 16.279% و6 عزلات من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* وبنسبة 6.977%، وبكتريا *Gardnerella vaginalis* التي كان عزلتان فقط وبنسبة2.325%، وبكتريا *Proteus mirabilis* فقد كانت عزلة واحدة فقط وبنسبة 1.163%.

وبأستعمال تقنية سلسلة تفاعل البلمرة (PCR) ثبت ان جين (exoA) وجين (exoS) اللذان يشفران لأنتاج السموم وجين(algD) والذي يشفر لأنتاج المحفظة موجودة في بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* وبنسبة 100% للجينات الثلاثة، وكذلك تم دراسة عوامل الضراوة لبكتريا *Staphylococcus aureus* وجد ان جين (hla) الذي يشفر انتاج الفا هيمولايسين موجود بنسبة 66.66% وجين (finbA) الذي يشفر أنتاج بروتين الالتصاق موجود بنسبة 100%، وكذلك تم التحري عن بعض عوامل الضراوة للبكتريا المهبلية التي شملت قدرتها على انتاج انزيم الهيمولايسين واليوريز وانزيم البروتيز.

المقدمة Introduction:

يعد التهاب المهبل من احد الامراض التناسلية واكثرها شيوعا لدى النساء في فترة الحمل والانجاب حيث تعتبر التهابات الجهاز التناسلي امرا مقلقا خلال فترة الحمل،والسبب الاكثر شيوعا للإفرازات غير الطبيعية، وقد ارتبط وجود التهاب المهبل بعدد كبير من المضاعفات مثل الولادة المبكرة وتمزق الاغشية قبل الاوان (الاجهاض المفاجئ) والتهاب بطانة الرحم، التهابات ما بعد الجراحة

* Corresponding author at: Department of Biology, College of Education for woman, University of Anbar
E-mail address

وعدوى السائل المحيط بالجنين، حيث اثبتت الدراسات ان بكتريا المهبل يمكن ان تنتقل الى بطانة الرحم وتغزو المشيمة مؤثرة بذلك على تكوين المشيمة وعلى نمو الجنين(1).

ان زيادة معدلات الاصابة بالبكتريا لم تكن بسبب مقاومتها المتعددة للمضادات الحياتية فحسب، وانما لامتلاكها العديد من عوامل الضراوة التي تزيد من شدة امراضيتها ومن هذه العوامل انزيمات الهيمولايسين واليوريز والبروتيز والليسثيز واللاييز والبيتالاكتاميز وقابليتها على تلزين كريات الدم الحمراء للإنسان والالتصاق بالخلايا الطلائية الظهارية(2).

ان الانواع البكتيرية الموجودة بصورة طبيعية في المهبل هي بكتريا *Lactobacillus* اضافة الى انواع اخرى هوائية او لاهوائية، وتكون وظيفتها توفير الدفاع ضد العدوى عن طريق الحفاظ على مستوى الحامضية PH في المهبل وضمان وجود بيروكسيد الهيدروجين في الاعضاء التناسلية، على نقيض ذلك فأن التهاب المهبل البكتيري يكون متلازمة متعددة الميكروبات تؤدي الى انخفاض في تركيز العصيات اللبنية وزيادة نسبة البكتريا المسببة للإمراض(3). بالإضافة الى البكتريا فأن الخمائر والفطريات تعتبر ايضا من مسببات التهاب المهبل، بينما تعتبر الطفيليات والفيروسات مسبب اخر، حيث تسبب الكثير من الامراض كالتهاب عنق الرحم والثاليل التناسلية(4).

ولعل توجه الباحثين في المجال الطبي للاهتمام بهذه البكتريا له عدة مبررات منها ظهور سلالات من البكتريا مقاومة لأنواع عديدة من المضادات الحيوية إذ أصبح من الطبيعي عزل سلالات تعود لبكتريا المهبل تكون مقاومة لأكثر من مضاد حيوي واحد (5) من خلال امتلاكها للبلازميدات الناقلة التي أنتجت سلالات مقاومة كما تمتلك هذه البكتريا أيضا الجينات التي تتحرك تلقائيا لمقاومة المضادات أو من خلال امتلاكها آليات تغير المسار الذي يستهدف من قبل المضادات الحيوية(6).

استخدمت التقنيات الجزيئية مثل تقنية سلسلة تفاعل البلمرة Polymerase chain reaction لأجراء الاختبارات التشخيصية في المختبر لجينات البكتريا واكتشاف جينات المسؤولة عن عوامل الضراوة وجينات المسؤولة عن مقاومة البكتريا للمضادات الحياتية والتعرف على السلالات المقاومة والطافرة لما تتميز به هذه التقنية من دقة وحساسية عالية (7)، يعد نظام الأفراز exoS, exoA في بكتيريا *P. aeruginosa* من الانظمة التي تفرز سموما قوية وتسبب التهابات حادة هذه الجينات تكون محمولة على البلازميدات، يحتاج جين alg D لتنشيط عمله إلى جينات اخرى اضافية تنشط نسخ الاوبرون مثل جين alg B، لا تمتلك جميع سلالات *P. aeruginosa* هذا الجين على الرغم من كونه مهما في احداث العدوى وزيادة امراضية البكتريا وكذلك يمكن من تحريك زوائد البكتريا بكفاءة على جميع الأسطح (8)، كما يعد جين Sr 16RNA من الجينات التي يعتمد عليها في تشخيص كثير من الاجناس البكتيرية ويستخدم ايضا للتفريق بين الانواع البكتيرية(9).

اما جين hlA المسؤول عن انتاج الفا–هيمو لايسين من اهم عوامل الفوعة في بكتريا *S. aureus* ويكون مترافقا مع المرضى المصابين بالتهاب المهبل والتهاب المسالك البولية (10)، و جين *A Finb* هو بروتين فبرنوكتين Fibronectin Protein الذي يمكن البكتريا من الالتصاق على انسجة الجسم، ويعزز تشكيل الاجسام المضادة، تمتلك بكتريا *S. aureus* نوعين من جين Fnb هما جين *Fnb A* و *Fnb B* وبعض السلالات البكتيرية تمتلك نوعا واحدا وبعض السلالات تمتلك النوعين معا(11).

كما أشارت عدد من البحوث والدراسات في السنوات

الأخيرة الى أن البكتريا المهبلية تمتلك المئات من الجينات التي تسهم في ظهور السلالات تسبب الإصابة لعدد من المرضى وتكون مقاومة للمضادات الحيوية وبتطور التقنيات الجزيئية تم الكشف عن هذه الجينات والتغيرات الوراثية والمظهرية في هذه البكتريا.

تعتبر البكتريا من اهم الاسباب الخمجية التي تؤدي الى اصابة النساء بأمراض مختلفة والتي تسبب احيانا مضاعفات صحية خطيرة ولأهمية التلوث البكتيري استهدف هذا البحث عزل وتشخيص الانواع البكتيرية المسببة للالتهابات النسائية، والتحري عن بعض عوامل الضراوة لديها و دراسة جزيئية لبعض جينات الضراوة لبكتريا *S. aureus*, *P. aeruginosa*.

المواد وطرائق العمل Materials and Methods:

جمع العينات Sampling:

جمعت 250 عينة (مسحات) من النساء الحوامل وغير الحوامل في مدينة الرمادي وبأعمار تتراوح بين 17–45 سنة. واخذت المسحات من نساء مصابات بالتهاب المهبل حوامل في أشهر مختلفة من الحمل، وغير حوامل ونساء في فترة انقطاع الطمث وفترة ما بعد الولادة.

عزل بكتريا المهبل:

زرعت المسحات المأخوذة من المريضات على الاوساط الزرعية (Blood agar, MacConkey agar, Mannitol agar, Chocolate agar, Brain heart infusion broth) وحضنت الاطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24–48 ساعة . تم فحص النمو ومن ثم عمل زرع ثانوي (sub culture) من الاطباق التي أظهرت نتيجة موجبة.

تشخيص العزلات البكتيرية:

شخصت العزلات بالاعتماد على الفحوصات البكتريولوجية والكيميوحيوية، من خلال دراسة الصفات الزرعية للمستعمرات النامية على الاوساط الزرعية من خلال دراسة شكل وحجم ولون المستعمرات ومعرفة اذا كانت مخمرة للالكتوز من عدمه وكذلك اجري الفحص المجهري للخلايا البكتيرية بعد تصبيغها بصبغة غرام وفحصها تحت العدسة الزيتية للمجهر . اما الفحوصات الكيموحيوية التشخيصية شملت اختبار انتاج انزيم اللاكتيز وفحص الاوكسيديز واختبار تخمر السكريات . وكذلك تم التشخيص باستخدام جهاز Vitek2 system(2).

اختبار انتاج الأنزيمات:

فحص البروتيز Protease:

أجري هذا الاختبار على وسط آكار حليب الفرز المحضر وحسب ما ورد في المصدر(12).

- نقلت مستعمرة مفردة منماة على وسط الآكار المغذي بعمر 18–24 ساعة إلى الإطباق الحاوية على وسط آكار حليب الفرز بوساطة ناقل الزرع الميكروبي.
- حضنت الإطباق هوائياً في درجة حرارة 37 مْ لمدة 24–48 ساعة.
- ظهور منطقة تحلل حول المستعمرة النامية هو دليل على ايجابية الاختبار.

فحص الهيمولايسين Hemolysine

أستخدم في هذا الفحص الدم البشري للتحري عن قابلية العزلات البكتيرية المعزولة على إنتاج أنزيم الهيمولايسين . وضع الدم بعد سحبه في أنابيب زجاجية معقمة حاوية على 3% سترات الصوديوم (مادة مانعة للتخثر) بعدها أجريت عملية النبذ المركزي لجميع عينات الدم باستخدام أنابيب نبذ مركزي بلاستيكية معقمة

للتخلص من بلازما الدم والكولستيرول وللحصول على راسب كريات الدم الحمراء الذي غسل بالمحلول الملحي المعقم Normal saline ومن ثم استخدم معلق كريات الدم بنسبة 5% لتحضير أوساط الدم الزرعية، ثم زرعت العزلات على جميع أوساط الدم المحضرة ووضعت في الحاضنة في درجة حرارة 37م ° لمدة 24 ساعة لملاحظة قابلية العزلات على تحليل الدم (13).

اختباراليوريز Urease test :

لقح وسط urea agar المائل بطريقة الطعن والتخطيط بالبكتريا المراد فحصها وحضنت بدرجه 37م° ولمدة 24 ساعة إذ يعد تغير لون الوسط من اللون الأصفر إلى الوردي دلالة على إيجابية الفحص أما بقاء لون الوسط أصفر فيعد سالبا (14).

استخلاص الحامض النووي البكتيري Bacterial genomic DNA extraction

تم استخلاص الدنا البكتيري لبكتريا *P. aeruginosa* ,*S. aureus* بأستخدام العدة الجاهزة DNA extraction kit المجهزة من شركة Bioneer وحسب تعليمات الشركة المجهزة . وبأستعمال جهاز Nano drop spectrophotometer تم قياس تركيز الدنا المستخلص . وقياس نقاوته من خلال قراءة الامتصاصية بطول موجي 280/260 نانوميتر .

البادئات Primer:

أُستعمل زوج من البادئات المتخصصة المصممة لهذا الغرض حيث جهزت البادئات بشكل lyophilized من شركة Bioneer وذوبت في الماء المقطر , وتم تحضير تركيز نهائي مقداره 10 بيكومول/ميكروليتر (15)، والجدول التالي يمثل البادئات المستعملة في هذه الدراسة:

جدول(1) البادئات Primers المستعملة في هذه الدراسة مع تتابعاتها والحجم المتوقع لها.

Pseudomonas aeruginosa			
Target	**Primer 3>5---**	**Amplicon Size**	**Reference**
exoA *Secretion system* T2SS	**F:GACAACGCCCTCAGCA TCACCAGC R:CGCTGGCCCATTCGCT CCAGCGCT**	**396 bp**	**16**
exoS *Secretion system* T3SS	**F: CTTGAAGGGACTCGACAAGG R: TAAGTGATGCGCCTGGACTT**	**504 bp**	**17**
algD *Antiphago cytosis*	**F: ACGAAGTGGTGGCGAGTTC R: TGGTGTGCGGCATGAAGC**	**126 bp**	**16**
16SrRNA Identification	**F: GGGGGATCTTCGGACCTCA R: TCCTTAGAGTGCCCAAACCC G**	**618pb**	
***hla* Alpha hemolysin**	**F: GGT TTA GCC TGG CCT TC R: CAT CAC GAA CTC GTT CG**	**510 bp**	**18**
***fnbA* Fibronectin binding proteins**	**F: GCG GAG ATC AAA GAC AA R: CCA TCT ATA GCT GTG TGG**	**1150 bp**	

F: Forward R: Reverse

تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمرة:

تفاعل اجري الـPCR باستعمال عدة الـPremix-PCR:

المجهزة من قبل شركة Bioneer الامريكية وبحجم نهائي 20µL والجدول رقم (2) يوضح مكونات تفاعل الـPCR:

جدول (2): مكونات تفاعل سلسلة البلمرة واحجامه.

المواد	الحجم
Primer F	1.5مايكروليتر
Primer R	1.5 مايكروليتر
Distale water	12مايكروليتر
DNA template	5 مايكروليتر
الحجم النهائي	20مايكروليتر

تحضير هلام الاكاروز:

حضر هلام الاكاروز بإذابة 2 غرام من الاكاروز في 100مليلتير من محلول الدارئ TBE (1x) (حضر من مزج 10مل من

TBE 10X مع 90 مل من الماء المقطر)، سخن الاكاروز الى درجة الغليان لحين اكمال ذوبان الهلام وتركه ليبرد ثم اضيف اليه صبغة بروميد الاثيديوم بتركيز 0.5 مايكروغرام /مليلتر . ثم صب الهلام في قالب الصب اذ حضرت صفيحة اسناد الاكاروز بعد ان ثبت المشط لتكوين الحفر المعدة لحمل العينات، صب هلام الاكاروز بهدوء في الصحيفة لمنع حدوث فقاعات هوائية وترك ليتصلب لمدة 30 دقيقة. رفع المشط بهدوء من الاكاروز المتصلب ثبتت الصحيفة على مسندها في وحدة الترحيل الكهربائي الافقية المتمثلة بالحوض المستخدم للترحيل الكهربائي. ملئ الحوض بدارئ الـ(1x TBE) بحيث يغطي سطح الهلام وذلك لقراءة نتيجة تفاعل سلسلة البلمرة PCR product.

النتائج والمناقشة:

العزل:

اظهرت نتائج الزرع اظهرت نتائج الزرع البكتيري ان 86 عينة فقط من المجموع الكلي للعينات اعطت زرع بكتيري موجب وبنسبة 34.4% بينما كانت نتيجة الزرع البكتيري السالب 164 عينة وبنسبة 65.6%، وقد توافقت تلك الدراسة مع (19) لعينات مأخوذة من اناث تعاني من التهاب المجاري البولية والتناسلية ان عدد الزرع البكتيري الموجب 93 وبنسبة 27% والزرع البكتيري السالب كان 227 وبنسبة 71% .

وقد يكون سبب ذلك هي تناول النساء للمضادات الحياتية لمدة طويلة وبشكل مستمر والذي يعد من الاسباب الرئيسية في اختفاء جراثيم المهبل، وكذلك يعود السبب لكون الافرازات المهبلية تساعد في تنظيف المهبل وتخليصه من البكتريا الممرضة وتحافظ على رطوبة المهبل، فأن جفاف المهبل يسبب في قتل البكتريا النافعة ويسبب خلل في التوازن الميكروبي مما يجعلها اكثر عرضة للإصابة بالعدوى(2).

الفحص المجهري:

اعطت نتائج الفحص المجهري للشرائح المحضرة من بعد تصبيغها بصبغة كرام 86 عزلة موجبة الزرع البكتيري بوجود 48 زلة موجبة لصبغة كرام وبنسبة 55.81%، و 38 عزلة سالبة لصبغة كرام وبنسبة 44.18% كما في الجدول رقم(3).

جدول (3) يبين اعداد والنسبة المئوية للبكتريا حسب تلونها بصبغة كرام

المجموعة	العدد	النسبة المئوية
بكتريا موجبة لصبغة كرام	48	55.814
بكتريا سالبة لصبغة كرام	38	44.186

وقد توافقت هذه النتيجة مع (20) الذي وجد نسبة البكتريا الموجبة لصبغة كرام 30%، ونسبة البكتريا السالبة 25%. ولم تتوافق مع (19) الذي وجد ارتفاع عدد البكتريا السالبة لصبغة كرام على البكتريا الموجبة لصبغة حيث وصل عدد البكتريا السالبة لصبغة كرام 68 وبنسبة 73.1% وعدد البكتريا الموجبة لصبغة كرام 25 وبنسبة 26.9%.

الجراثيم المعزولة من النساء المصابات بالتهاب المهبل البكتيري:

شملت البكتريا الموجبة لصبغة كرام بكتريا *S. epidermidis* وكان عددها 18، وبكتريا *S. aureus* وكان عددها 9 عينات، وبكتريا *Strept. Pneumoniae* وكان عددها 7 عزلات وكذلك بكتريا *S. Saprophyticus* وبلغ عددها 6 عزلات ، وبكتريا *Strept. pyogenes* وكان عددها 4 عزلات وكان عدد بكتريا *B. subtilis* ثلاثة عزلات فقط.

اما البكتريا السالبة لصبغة كرام فقد شملت الانواع البكتيرية التالية، بكتريا *E. coli* وكان عددها 5 عزلات ، وعدد بكتريا *K. pneumoniae* 14 عزلة ، وبكتريا *P. aeruginosa* بلغ عددها

6 عزلات، ثم بكتريا *G. vaginalis* التي كان عددها عزلتان، اما بكتريا *P. mirabilis* فقد كانت عزلة واحدة فقط، كانت نتائج تلك الدراسة مقاربة لنتائج (19)، الذي وجد نسبة بكتريا *S. aureus* 11.8%، وبكتريا *P. aeruginosa* بنسبة 6.5%، ولم تتفق نتائج هذه الدراسة مع نفس المصدر من حيث نسبة بكتريا *K. pneumoniae* التي كانت 6.5%، وبكتريا *E. coli* بنسبة 51.6%.

جدول (4) يوضح عدد والنسبة المئوية للبكتريا المعزولة

البكتريا المعزولة	عدد العزلات	النسبة المئوية للعزلات
Staphylococcus epidermidis	18	20.93
Escherichia coli	15	17.442
Klebsiella pneumoniae	14	16.279
Staphylococcus aureus	9	10.465
Staphylococcus saprophyticus	6	6.977
Streptococcus Pneumoniae	7	8.140
Pseudomonas aeruginosa	6	6.977
Streptococcus pyogenes	4	4.651
Bacillus subtilis	3	3.488
Gardnerella vaginalis	2	2.325
Proteus mirabilis	1	1.163
Streptococcus viridans	1	1.163
المجموع	86	

توزيع نتائج الزرع البكتيري على اساس الفئات العمرية:

لقد شملت الدراسة النساء اللاتي تتراوح اعمارهن بين 45-17 سنة وقد تم توزيعها *الى* ثلاث فئات عمرية، وجد ان الفئتين العمرية 17-26, 27-36 سنة هي الفئة الاكثر اصابة بالتهاب المهبل البكتيري اذ كانت نسبة الزرع البكتيري الموجب (ظهور نمو في الوسط الزرعي ويشمل البكتيريا الموجبة والسالبة للصبغة كرام) لدى هذه الفئات 32.55%، 45.34% على التوالي من مجموع الاصابات الكلي للعينات قيد الدراسة، وكانت الفئة العمرية 37-46 هي الاقل نسبة للزرع البكتيري الموجب اذ شكلت نسبتها 22.09% كما في الجدول رقم(5)، اختبار كاي اظهر عدم وجود فروق معنوية تحت مستوى احتمال 0.05 بين الزرع البكتيري السلبي (عدم ظهور نمو) والايجابي، أي ان تأثير العمر على الزرع غير معنوي.

جدول (5) يوضح نتائج الزرع البكتيري على اساس الفئات العمرية.

العمر	زرع بكتيري سالب	النسبة المئوية	زرع بكتيري موجب	النسبة المئوية
17-26	56	34.14	28	32.55
27-36	64	39.02	39	45.34
37-46	44	26.82	19	22.09
المجموع	164	65.6	86	34.4

في الفئة العمرية 17-26, 27-36 سنة يزداد النشاط الجنسي حيث تمثل تلك السنين التي يحدث فيها الزواج، وتكون الهرمونات التكاثرية الى اعلى مستوياتها وترتفع حامضية المهبل وبذلك يحدث خلل في التوازن الميكروبي وتكثر البكتريا الممرضة، وكانت الفئة العمرية 37-46 سنة حيث تتراجع حامضية المهبل PH وتنخفض مستوى الهرمونات التكاثرية وبذلك تقل نسبة تواجد البكتريا المرضية تتفق تلك الدراسة مع (21).

دراسة عوامل الضراوة:

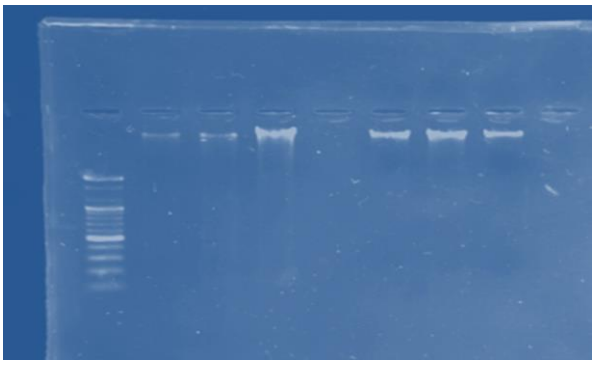
لقد بينت نتائج الدراسة بكتريا *S. aureus* قد انتجت الهيمولاسين بنسبة 77.77% وقد توافقت هذه الدراسة مع دراسة اجرتها (22)، في حين ان بكتريا *P. aeruginosa* لم تنتج الهيمولاسين.

اما انزيم المحلل للبروتين Protease فأن بكتريا *S. aureus* انتجت الانزيم بنسبة ,33.33% وكانت النتيجة مقاربة ل (23) حيث وجد 40% من البكتريا تنتج الانزيم Protease، وقد انتجت عزلتين من *P. aeruginosa* من مجموع 6 عزلات وبنسبة 33.33% وجد (24) ان 5 عزلات من اصل 20 عزلة انتجت الانزيم حيث اشار ان هناك سلالات قد تنتج الانزيم وسلالات اخرى غير منتجة له.

لقد اشارت النتائج ان قابلية بكتريا *S. aureus* على انتاج انزيم اليوريز Urease كانت بنسبة 100% كانت نتيجة هذه الدراسة مقاربة مع (2) حيث وجد ان قابلية بكتريا *S. aureus* بنسبة 60%، في حين ان بكتريا *P. aeruginosa* لم تنتج انزيم اليوريز.

استخلاص الـ DNA من العزلات البكتيرية:-

تم استخلاص الحامض النووي DNA من عزلات, *P. aeruginosa S. aureus* المعزولة من التهاب المهبل والبالغ عددها 6 عزلات، اجري الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز المحضر بتركيز 1.5% وفرق جهد 90 فولت ر وزمن ساعة واحدة للكشف عن حزم Bands الـ DNA المستخلص او الناتج من الـ PCR ثم مقارنته مع سلم الحامض النووي DNA 100-1500 bp Ladder. وبعد ترحيل الـ DNA المستخلص على هلام الأكاروز اظهرت نتائج وجود الحزم bands الـ DNA من جميع العزلات وبشكل واضح يدل على التركيز والنقاوة العاليين كما في الشكل(1)، حيث ان تركيز DNA بكتريا *P. aeruginosa* 215 ug\ml ومقدار النقاوة كانت 1.783، اما بكتريا *S. aureus* كان تركيز 178.3 ug\ml DNA والنقاوة 1.975.



الشكل (1) الترحيل الهلامي الكهربائي لدنا العزلات البكتيرية .
العمود M : الدنا قياسي . العمود 3,2,1 :يمثل عزلة 3 . 2.1 على التوالي لبكتريا *P. aeruginosa*. العمود 6,5,4 : يمثل عزلة 3 . 2.1 على التوالي لبكتريا *S. aureus*

الكشف عن جين exoS, exoA المسؤول عن نظام الأفراز في بكتريا *P. aeruginosa*:-

بعد ترحيل النتائج على هلام الأكاروز وفحصه بالأشعة فوق البنفسجية ظهرت الحزم bands مما يعني وجود الجين المستهدف في العزلات البكتيرية كما في الشكل (2) وكانت الظروف المثلى لدرجة حرارة مرحلة الألتحام لجين exo A هي 68 مْ، ولجين exo S هي 58 مْ.

تم اجراء تفاعل البلمرة التسلسلي عن طريق اختيار الظروف المثلى من أجل تضخيم exoA، أظهرت النتائج 3 عزلات من بكتريا *P. auroginosa* تمتلك جين exo A, exo S وبنسبة 100% لكل منها، وقد كانت نتائجنا متقاربة مع (25) الذي وجد ان نسبة البكتريا التي تمتلك exo A هي 65%.

إن هذه الجينات تكون محمولة على البلازميدات لذلك فإن وجود جين من جينات الفوعة يعود لعدة اسباب منها اليات التبادل

الوراثي بما في ذلك عملية التحول والتتبع و الأقتران التي تؤثر على وجود الجين في البكتريا من عدمه لتتكيف البكتريا مع الظروف المتغيرة من خلال الحصول على معلومات جينية جديدة، كما ان التتابعات الوراثية قد تكون موجودة في بعض العزلات وغير موجودة في اخرى أو يعاد ترتيبها(8).

الكشف عن جين *alg D* في بكتريا *P. aeruginosa*:-

تم اجراء اختبار التفاعل التضاعفي لسلسلة الـ DNA باستخدام بادئ جين *alg D* وبحجم جزئي 126bP الذي يقع في المنطقة الكروموسومية، إذ أن هذا الجين يحمل البكتريا مقاومة البلعمة والتي تعتبر سمة رئيسية لدى البكتريا تمكنها من مقاومة هجوم كريات الدم البيضاء اللاقمة وهذه الوظيفة تقوم بها الكبسولة الخلوية, وبالتالي تعزز البكتريا على احداث المرض.

بعد اجراء تفاعل PCR وايجاد درجة الحرارة المثلى لذلك التفاعل رحلت نتائج ال PCR على هلام الاكاروز بتركيز 1.5% وعند فحصه تحت الأشعة فوق البنفسجية ظهرت الحزم ذات حجم جزيئي 126 زوج قاعدي للعزلات البكتيرية مما يعني وجود الجين كما في الشكل (2)، وقد بينت نتائج هذه الدراسة إن 100% من البكتريا تمتلك هذا الجين وبذلك كانت هذه النتيجة مخالفة لنتيجة (26)، حيث وجد نسبة البكتريا التي تمتلك هذا الجين 40% ومقاربة لنتيجة (27) الذي وجد ان نسبة البكتريا التي تمتلك *alg D* 90.9% .

قد يحتاج هذا الجين لتنشيط عمله إلى جينات اخرى اضافية تنشط نسخ اوبرون *alg D* مثل جين *alg B*، لا تمتلك جميع سلالات *Pseudomonas aeruginosa* على الرغم من كونه مهم في احداث العدوى وزيادة امراضية البكتريا وكذلك يمكن من تحريك زوائد البكتريا بكفاءة على جميع الأسطح .قد يكون سبب ذلك هو تأثير الظروف البيئية الذي يمنع من التعبير عن هذا الجين مثل مستوى الكاربون والنتروجين والفوسفات ومعدل النمو.

الكشف عن جين 16sr RNA المسؤول عن تشخيص بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*:-

يعتبر هذا الجين من الجينات التي يعتمد عليها في تشخيص كثير من الاجناس البكتيرية ويستخدم ايضا للتفريق بين الانواع البكتيرية، لذلك يتم التحري عن هذا الجين باستخدام تقنية التفاعل التضاعفي لسلسلة الـ DNA باستخدام بادئ جين 16sr RNA وبحجم جزيئي 188 زوج قاعدي، و تم ضبط الظروف المثلى لهذا التفاعل من خلال اعادة التجربة عدة مرات من أجل الحصول على حزم واضحة الوهج عند ترحيلها على هلام الأكاروز بتركيز 1.5% وفحصها تحت الأشعة فوق البنفسجية وقد ظهر أن جميع العزلات البكتيرية تمتلك هذا الجين وبنسبة 100% كما في الشكل (2) وهذه الدراسة مطابقة ل (28) والذي اشار إلى ان جميع العزلات البكتيرية تمتلك هذا الجين والذي يعطي تشخيص للجنس والنوع، ويعد الشفرة الوراثية الثابتة للنوع يستخدم هذا الجين في دراسات النشوء والتطور ويستخدم ايضا في الدراسات التفريقية ولوصف الانواع البكتيرية التي لم يتم استزراعها بنجاح (9).

الشكل (2) يوضح الترحيل الهلامي الكهربائي لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa*. العمود M: الدنا قياسي. العمود 3,2,1: جين *exoS Secretion system*. العمود 6,5,4: جين .

العمود 7,8,9: exoA Secretion system جين algD Antiphagocytosis. العمود 10,11, 12: جين 16SrDNA Identification.

الكشف عن جين *hlA* المسؤول عن انتاج الفا-هيمو لايسين في بكتريا *Staphylococcus aureus*:-

تم التحري عن الجينات المشفرة لإنتاج الفا-هيمو لايسين *hl A* وبحجم bp 396 وباستخدام تقنية PCR وتم ضبط درجة حرارة مرحلة الاستطالة (Anealing Temparture) عند 58 مْ.

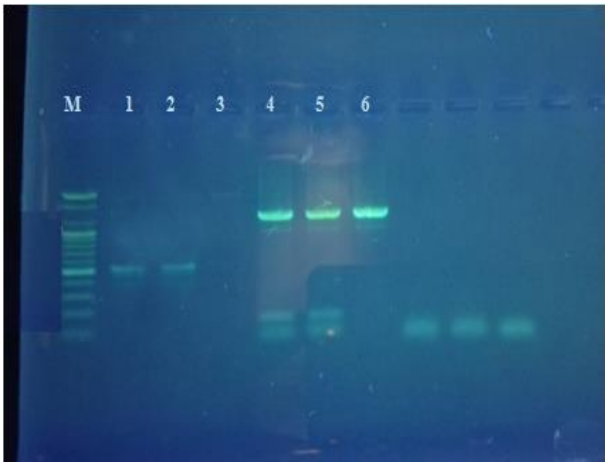
وبعد اخذ نتائج PCR ووضعها على هلام الأكاروز بتركيز 1.5% يتم الترحيل الكهربائي ظهرت حزم الجين وبنسبة% 66.66 أي ظهرت لـ2 عزلة بكتيرية من أصل 3 عزلات بكتيرية من *S. aureus* تمتلك هذا الجين كما في الشكل (3)، بينما كانت نتيجة الترحيل الكهربائي لنفس الجين عند (29) 75%، وكانت النتائج مقاربة لما وصل اليه (30) اذ وجدوا أن نسبة البكتريا التي تمتلك جين *hl A* هي 60%.

نستتج من ذلك أن المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من التهاب المهبل لها القدرة على تحليل الدم مما يجعلها اكثر ضراوة وقدرة على احداث التهابات شديدة لدى المرضى، حيث ينشط هذا الجين ضد مجموعة من الخلايا المضيفة بما في ذلك كريات الدم الحمراء والخلايا وحيدة النواة، اذ يكون جين الفا- هيمولايسين مترافقا مع المرضى المصابين بالتهاب المهبل والتهاب المسالك البولية (10)، كذلك الصفائح الدموية تكون أكثر حساسية لسموم الفا-هيمولايسين، لذلك فان معظم العزلات البكتيرية البشرية من *S. aureus* تعبر عن سموم الفا-هيمولايسين ولا تعبر عن سموم بيتا-هيمولايسين.

الكشف عن جين *Finb A* في بكتريا *S. aureus*

تم التحري عن هذا الجين في بكتريا *S. aureus* باستخدام تقنية PCR من خلال استعمال قطع الـ DNA ذات عدد محدد وتعمل كبادئات من نيوكليوتيدات متخصصة لجين الضراوة، تم برمجة الجهاز للوصول إلى الظروف المثلى كانت نتائج هذه الدراسة 100% من العزلات انتجت هذا الجين أي أن 3 عزلات بكتيرية انتجت الجين *Fnb A* كما في الشكل (3), في حين كانت نتيجة (31) 17% من عزلات *S. aureus*، وكانت معزولة من مصابين بالتهاب القناة البولية في نيجيريا، بينما كانت لدى (11) نسبة عزلهم للبكتريا التي تمتلك الجين 100%.

ان ارتفاع نسبة الجين المشفر لإنتاج السموم قد يكون بسبب النقل الأفقي لجينات الضراوة بين سلالات *S. aureus* أو بسبب موقع العزلة (11).



الشكل (3) يوضح الترحيل الهلامي الكهربائي لبكتريا *Staphylococcus aureus*. العمود M : الدنا قياسي . العمود 1,2 : جين Alpha hemolysin *hla* . العمود 4,5,6 : جين *fnbA* Fibronectin binding proteins

References **المصادر**

1- Deborah, B. N. and George, M. (2002). Bacterial Vaginosis in pregnancy: current finding and future direction . Epidmio1 Rev. Vol.24 P:102-108.

2-علي، منى جلال (2010). دراسة عوامل الضراوة للجراثيم المسببة لالتهاب المهبل البكتيري لدى النساء. رسالة ماجستير، قسم تقنيات الموارد المائية، المعهد التقني الحويجة.

3-Mark, H.; yadin, M.D.; Deborah, M. and Money, M.D. (2008) Screening and Management of Bacterial Vaginosis in Pregnancy. SOGC Clinical Practice guideline P: 702-708.

4- William, W.B. (1997) .Obstetrics and Gynecology 4th ed.,Edited by Williams and wilikins, middle East Ediation, Egypt .

5-Carolin, M.; Hara,O.; Frances,W. and Michael,J.M.(2000) . Classification, identification and Clinical significance of *Proteus*, *Provedencia*, and *Morganella*. Vol.13 No.(4) P: 534-546 .

6- Iwona, B.; Julin, F. and Jaunne, N.(2012) *Pseudomonas aeruginosa* pili and Flagella Mediate Distinact Binding and Signaling Events at the Apical and Basolateral surface of Air way Epithelium . International Journal of Antimicrobial Agents ;Vol. 42 P: 211-219.

7-Dmitri V. ; Robert F.; Phillips G. and Linda S. (2001). Functhonal analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine 1-carboxamide for *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Journal of Infection Disease; Vol.193 P:645-54.

8- Matar, G.; Ramlaw, N.; Hijazi, I. and Khneisser, A. (2002). Transcription levels of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A Gene and severity of Symptoms in patients with otitis external curr. Micro. J.; Vol. 16 (2), PP. 167-172.

9- Jiang, X.; Zhang, Z. L.; Zhou, D.; Ruan, F. and Lu,Y.(2014). Detection,F. extended-spectrum B-Lactamase in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Ant-imicrob agent and chemother, Vol.50.p.2990-2995.

10- Moravej,Z.; Tabatabaei, M.; Shirzad, A. and Khoshbakht,, R.(2015) .Characterization of hemolysins of *Staphylococcus* strains isolated from human and bovine, Southern lran. Iranian Journal of veterinary Research . Vol.15 No.(4) P:326-330..

11- جواد، مصطفى رعد، يوسف، ميثم غالي(2012). التحري عن عوامل الضراوة والمقاومة للمضادات الحيوية في البكتريا المعزولة من حالات سريرية مختلفة في مدينة الديوانية. قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة القادسية. ص:1-22.

12-Benson, H.J. (2002). Microbiological applications : laboratory manual in general microbiology. (8th ed.), complete version. McGraw-Hill. U.S.A

13 ابو ريشة، رسمية عبد، سلوم، دنيا فريد وخليل، لميس (2007). دراسة تأثير الفا هيمولايسين المنتج من Staphylococcus aureus على عملية البلعمة خارج الجسم الحي . المجلة العراقية للعلوم، قسم علوم الحياة، كلية

14- MacFaddin, J.E.(2000). Biochemical test for identification of medical bacteria. "3rd ed.''. Lippn CottWilliams and wilkins. Philadelphia. U.S.A.

15- Harding, E.N.; Cleary, J.M.; Cabanas, P. K.; Rosen, I.G.and Kang, K. S.(1987) . Genetic and physical analyses of acuter of genes essential for xanthan gum biosynthesis in Xanthomonas campestris. J Bacteriol .169(6) : 2854 -2861.

16- Sedighe,C.R.; Behzad, K.N.;Nezhad,H. and Mohammed, N.E.(2013). Detection of algD, oprL and exoA Genes by new specific primers as an efficient, rapid and Accurate proceder for direct diagnosis *Pseudomonas aeruginosa* strains inclinical samples . Jundishapur microbial . 7(10): e13583 .

17-Lanotte, P. ;Watt, S. ; Mereghetti,L. Goudeau, A. (2004) Genetic features of *P. aeruginosa* isolated from cystic fibrosis Patient compared with those of isolates from other orings . . Journal of medical Microbiology . 53, 73-81 .

18-Mary,C. Booth, M. Michelle, C. and Michael, S.(2001) Clonal Association among *Staph. aureus* Isolated from Various sites of infection, Infection and Immunity P, 345-352 .

19-الحديثي، دريد صيهود (2010) . دراسة فعالة المضادة للبكتريا في بعض النباتات الطبية ضد البكتريا المسببة لالتهاب المجاري البولية . كلية العلوم، قسم علوم الحياة . الجامعة الحرة في هولندا.

20- Spiegel, C.A. and Amsel, R. and Holmes, K.K. (1983). Diagnosis of bacterial vaginosis by direct gram stain of vaginal fluid. Us national library of Medical. Vol.18No.(1) P: 170-7.

21- العاني، احلام عجاج (2006) . دراسة تأثير مستخلصات نبات الاشنان Seidizia rasmorinus على نمو بعض الجراثيم المرضية المسببة لالتهابات المهبلية . رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة بغداد .

22- الياسري، اسراء عتاب، الشامي . زينه محمد (2005). دراسة بكتريولوجية لعزل وتشخيص بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية Staph. aureus والمعزولة من عينات سريرية مختلفة في محافظة النجف. كلية الطب، جامعة الكوفة .

23- Lindsey, S.; Ewa, G.; Jan, P. and simon, J.F. (2004). The role and regulation of the extracellular proteases of *staphylococcus aureus*. Microbiology. Vol.150, P: 217- 228.

24- Kazuyuki, M. and Hiroshige, T. (1977). Production of protease and Elastase by *Pseudomonas aeruginosa* strains Isolated from patients. American society for Microbiology. P: 679-695.

25- Alina –Maria, H.; Mariana, C.C.; Ani, I. C.; Coralina, B. and Veronica,L. (2013). Virulance markers in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospital- aqaired infections occurred in patients with underlying cardiovascular disease, Romanian Biotechnological Letters. University of Bucharest. Vol. 18. P: 8843-8854.

26- Katarzyna, W. and Piotr, S. (2009) .Genetic features of clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains. Vol. 58 No. (3).P: 255-260.

27- Sedighe, R.T. ; Behzad, K. and Ensanollah, G.(2013). Detection of alg D, opr L, and exo A Genes by new specific primers as an Efficient, Rapid and Accurate procedure for Direct Diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* strains in

clinical sample, Jundishapur,Journal of Microbiology.

28- Mohammed, E.A. ;Ismail, H. A.and Abeer, A., M. (2014).Identification pseudomonas aeruginosa species that isolated from patients and environment .Baghdad science Journal. Vol. 11No.(2) P:1028-1034.

29- الناشي، علي عبد الرحيم، المنصوري، ريام وسام حسن (2016) . التحري عن الطراز المظهري والجزيئي لعوامل الضراوة لبكتريا Staphylococcus spp. المحللة للدم والمعزولة من التهاب المسالك البولية في الديوانية . رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة القادسية .

30- Silva, P. V. ; Cru Z, R.S; Keim, L.S.; Depula, G.R.;Carvalho, M. C. D., Rosa, J.M.(2013).The antimicrobial susceptibility biofilim formation and genotypic profiles of staph. Haemolyticus from blood stream infection. Men inst. Oswaido.Cruz. Rio. De. Janeiro, 108 (6): 812.816.

31- Baba- Moussa, L.; Anani. L.; Scheftel, J.; M couturier, M.; Haikou, N.; Hounsou, F.; Monteil, H.; Sanni, A. and prevoste G. (2008). Virulnace factors produced by strains of *Staphylococcus aureus* isolated from urinary tract infection. J. Hosp. infect,Vol (968) P: 32-38.

P- ISSN 1991-8941 E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2018,12 (1) :18-30

Molecular study to some Virulance gene of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* bacteria isolated from women suffered from bacterial vaginitis

Wrood Mutleb Farhan **Hana'a Abd AL-latef Yaseen**

Department of Biology, College of Education for woman, University of Anbar

Abstract :

The study included 250 vaginal swabs were collected from women patients clinical symptoms of bacterial vaginitis and they have come to the women's and children's hospital in Ramadi and ages (17- 45 years) nearly, to Investigation of the bacterial species positive and negative gram stain were Infected of the vagina, and also To determination the appearance and molecularly of virulence factors.

The vaginal swabs were cultured, 86 samples were found to give positive growth of 34.4%, but (164 sample) 65.6% were negative. The growing isolates were subjected to bacteriological and biochemical tests. The isolates of positive gram stain 48 about 55.81% were having character of *Staphylococcus epidermidis* 18 about 20.93% and *Staphylococcus aureus* (9 (10.46%), *Streptococcus pneumoniae* 7 nearly 8.13%, *Staphylococcus saprophyticus* 6 about 7.97%, *Streptococcus pyogenes* 4, (4.65%) and *Bacillus subtilis* only 3, (3.48%) and *Streptococcus viridans* was only 1 isolate about 1.16% .

The isolates of negative gram stain were recorded 38 percentage 44.18% . The results of the tests a bacteriological and biochemical were recorded *Escherichia coli* 15 isolates percent 17.44% and 14 of *Klebsiella pneumoniae* 16.27%, *Pseudomonas aeruginosa* was 6 percent 7.97%, *Gardnerella vaginalis* 2 about 2.32%, and *Proteus mirabilis* was one isolate only percent 1.16% .

The polymerase chain reaction (PCR) technique were proved, the exoA and exoS genes were encodes toxin production. algD was encoded the production of the capsule which were found in *Pseudomonas aeruginosa* percent 100% for the three genes. In *Staphylococcus aureus* found that (hla) gen that encodes production of alpha-hemolycin 66.66% and finbA which encodes the production of (adhesion protein) 100%, as well as investigate some of the virulent factors of the vaginal bacteria, which included their ability to produce the enzyme hemolysis, urease and protease.