# * دراسة جزيئية لأنزيم neuraminidase في بكتريا *Bacteroides fragilis* المعزولة من مرضى خمج اللوزتين المزمن في مدينة الديوانية

**هيام عبدالله واوي الشباني**

كلية العلوم

جامعة القادسية

hiyamabd91@gmail.com

**ميثم غالي يوسف**

كلية العلوم

جامعة القادسية

Maitham722003@yahoo.com

**الخلاصة:**

تم استئصال 224 لوزة من 112 مريض خلال المدة من شهر تشرين الاول 2014 ولغاية شهر أيار 2015. أعمار المرضى تراوحت من 3–40 سنة، حيث كانت 63 (56.25%) حالة من الذكور و 49 (43.75%) حالة من الإناث. قسمت اللوز إلى قسمين الأول (112) لوزة وفيه تم الحصول على (30) عزلة من بكتريا *Bacteroides fragilis* وبنسبة 26.78% من مجموع 112 لوزة . شخصت بواسطة الطرق البكتريولوجية القياسية وتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) أما القسم الأخر (112) فقد تم الحصول فيه على (57) عزلة من *B.fragilis* وبنسبة 50.89 %.شخصت بواسطة تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل المباشر (Direct PCR) وكلا الطريقتين الجزيئية تمت باستخدام الجين التشخيصي (*nanH*).

تم استخدام بادئات نوعية (Primers) في تقنية الـ PCR وتقنية الـ Direct PCR للتحري عن جين *nanH* المسؤول عن التشفير لأنزيم neuraminidase , وقد أظهرت النتائج امتلاك كافة العزلات (30 عزلة) للجين *nanH* في تقنية الـ PCR, أما تقنية الـ Direct PCR فقد أظهرت 57 عزلة من أصل (112) لوزة امتلاكها الجين *nanH* وبالتالي تقنية الـ Direct PCR أعطت نسبة أعلى من الطرق البكتريولوجية القياسية لعزل *B.fragilis* .

الكلمات المفتاحية: خمج اللوزتين المزمن , *Bacteroides fragilis* , neuraminidase , Direct PCR

---

* البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الأول.

**1.المقدمة:**

تعد اللوزتين من الأنسجة اللمفاوية المهمة في الدفاع عن الجسم فلها أهمية كبيرة في حماية كل من الممر التنفسي والممر الهضمي من دخول العوامل المخمجة مثل البكتريا والرواشح (4) ويعتبر مرض خمج اللوزتين Tonsillitis من أكثر أمراض الحلق شيوعاً في مختلف بلدان العالم إذ ترتفع نسبة الإصابة به عند الأطفال في الفئات العمرية من 3–9 سنوات, وتستمر حتى مرحلة المراهقة لتقل فيما بعد إذ تكاد تختفي في عمر 50 سنة (9) , ومن أهم المسببات لمرض خمج اللوزتين المزمن هي المسببات الفيروسية وتشمل Reovirus , Epstein - Barr Virus ,Echo virus,Adenovirus و Influenzae virus , أما المسببات البكتيرية الهوائية تشمل Group A β hemolysis Streptococci ، *Haemophilus* , Group B,C,G Streptococci ,streptococcus *pneumonia* , *influenzae* *Staphylococcus* ,*Moraxella catarrhalis* , *Haemophilus parainfluenzae* ,*aureus* *Nisseria spp.* و*Mycobacterium spp.* واللاهوائية تشمل *Peptococcus spp., Bacteroides spp.* و*Peptstreptococcus spp.*, *Actinomyces spp.* ونادراً ما يتسبب من قبل الفطريات والطفيليات (10), ومن الأنواع الأكثر شيوعاً لجنس *Bacteroides* هي *Bacteroides fragilis* التي تعد من الممرضات الانتهازية وتسبب بالإضافة إلى خمج اللوزتين المزمن العديد من الإصابات المعوية وغير المعوية (14). بعض سلالات هذه البكتريا والمعروفة بالعصوانية الهشة المنتجة للذيفان المعوي enterotoxigenic *B. fragilis* (ETBF) داخل القناة الهضمية تنتج سموم معوية تدعى fragilysin والتي تسبب الإسهال وقيح معوي ناتج من دخول محتويات الأمعاء إلى التجويف البطني وتلف أنسجة القناة الهضمية, وفي حالات نادرة يمكن أن تسبب سرطان cancer (11). ترجع إمراضيه هذه البكتريا إلى وجود عوامل ضراوة متعددة أهمها أنزيم neuraminidase (NANase) أو يدعى sialidase الذي ينتجه جين *nanH* يعمل هذا الأنزيم على شطر الأواصر الكلايكوسيدية Glycosidic bond من أحماض السياليك sialic acids (5).

استهدفت الدراسة الحالية ما يأتي:- عزل وتشخيص بكتريا *B.fragilis* من مرضى خمج اللوزتين المزمن في مدينة الديوانية باستخدام الطرائق التشخيصية البكتريولوجية القياسية, الكشف عن وجود الجين التشخيصي(*nanH*) في عزلات بكتريا *B.fragilis* قيد الدراسة باستخدام تقنية الـ(PCR) العادي وتقنية الـ(PCR) المباشر.

**2.المواد وطرائق العمل:**

**جمع العينات**

تضمنت الدراسة 112 مريض ممن يعانون من خمج مزمن باللوزتين، وقد تم استئصال اللوزتين لهم بقسم الأذن والأنف والحنجرة (E.N.T.) في مستشفى الديوانية التعليمي في مدينة الديوانية خلال المدة من شهر تشرين الاول 2014 ولغاية شهر أيار 2015. بعد فحص المريض سريرياً وتشخيص حالة الإصابة من قبل الطبيب المختص والتأكد من ان المريض لا يأخذ المضادات الحيوية قبل أسبوع من الجراحة , تم أخذ مسحة من سطح اللوزتين قبل العملية بدقائق قليلة بواسطة مسحات قطنية مع وسط ناقل (Swap with Transport media) مع مراعاة تجنب منطقتي اللسان والبلعوم. اجريت عملية استئصال اللوزتين بتقنية التشريح ووضعت احدى اللوزتين في حاوية معقمة ثم حفظت بالثلاجة بدرجة 4- مْ وذلك لغرض إجراء تقنية الـ PCR المباشر (Direct PCR) عليها اما اللوزة الثانية فإنها وضعت اولاً في محلول Povidone - Iodine لمدة من 30 الى 45 ثانية ثم غسلت بالمحلول الملحي الفسلجي Normal saline المعقم وقطعت الى نصفين بواسطة مشرط معقم، ثم اخذت مسحة من لب اللوزة بواسطة مسحة قطنية جاهزة معقمة وحاوية على وسط غذائي مع مراعاة تجنب سطح اللوزة, بعد ذلك نقلت المسحات الى المختبر لإكمال خطوة الزرع البكتيري وتحديد نوع الإصابة البكتيرية (3) .

**العزل والتشخيص**

تم استخدام وسط أكَار اسكولين أملاح الصفراء للباكترويد Bacreroides Bile Esculin Agar (BBEA) (Himedia, India) كوسط انتخابي وتشخيصي لبكتريا *B.fragilis* , زرعت عليه المسحات المأخوذة من سطح ولب اللوزتين بطريقة التخطيط (Streaking) وحضنت لاهوائياً باستعمال المرطبان اللاهوائي anaerobic jar ووضع نظام التحضين اللاهوائي Gas pak (Oxoid, Japan) داخل هذه الحاوية, ثم حضنت بدرجة 37 مْ لمدة 24 –48 ساعة. تم تشخيص البكتريا بالاعتماد على الطرائق التشخيصية المذكورة في (8) و(7) من خلال ملاحظة تغير لون الوسط من الأصفر إلى الاسود , واصطباغ خلاياها بصبغة كَرام , النتيجة الموجبة لفحص الكاتاليز والسالبة لفحص الأندول , النمو بوجود 20 % من أملاح الصفراء .

**فحص تفاعل سلسلة البلمرة Polymerase chain reaction (PCR)**

تم أجراء فحص تفاعل سلسلة البلمرة المتسلسل لتحري عن جين الـ neuraminidase الخاص بتشخيص بكتيريا *B.fragilis* من عينات العزل البكتيري ومن عينات نسيج اللوز ويتكون الفحص من عدة خطوات:

**1. استخلاص الحمض النووي البكتيري والنسيجي Bacterial and Tissue genomic DNA extraction**

تم استخلاص الدنا (DNA) الجينومي لبكتريا *B.fragilis* قيد الدراسة حسب ما جاء في تعليمات الشركة المصنعة لعدة استخلاص الدنا الجينومي (Geneaid,USA) , وتم قياس تركيز ونقاوة عينات الدنا بواسطة جهاز قياس الكثافة الضوئي Nanodrop spectrophotometer (THERMO,USA) حيث إن أفضل نقاوة للدنا تكون ما بين (1.6–1.8), وأفضل تركيز للدنا ما بين (5–50) نانو غرام/مايكرو لتر.

**2. تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمرة PCR master mix**

تم تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمرة باستخدام عدة الـ AccuPower® PCR PreMix المجهزة من قبل شركة (Bioneer, Korea) وحسب تعليمات الشركة كما في الجدول (1). البادئات المستخدمة تم تجهيزها من قبل الشركة(Bioneer, Korea) (الجدول 2), وبعد اكمال تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمرة تم غلق الانابيب ومزجت بعناية بجهاز المازج vortex (Cyan Belgium), لمدة 5 ثواني. نقلت الانابيب لجهاز المبلمر الحراري الحلقي Thermal cycler (BioRad ,USA) لإجراء عمليات التضخيم وتمت برمجة الدورات الحرارية لجين neuraminidase ( الجدول 3).

**جدول (1): مكونات وحجوم مزيج تفاعل سلسلة البلمرة PCR master mix**

| ت | PCR master mix | | Volume |
|---|---|---|---|
| 1 | DNA template | | 5µL |
| 2 | Primers | Forward P. | 1.5µL |
| 3 | | Primer P. | 1.5µL |
| 4 | ماء الـ بي‌سي أر PCR water | | 12µL |
| 5 | المجموع Total | | 20µL |

**جدول (2): بادئ الدنا DNA primer**

| نوع البادئ | | *nanH* gene |
|---|---|---|
| تتابع البادئ | F | CCGGTAGTTCAAGCAGCAGA |
| | R | GCGCACTCCTACTCCCATAC |
| حجم التضخيم | | 528 bp |

F: Forword R: Reverse

**جدول (3): حالات الدورات الحرارية لفحص الـ PCR Thermocycler condition**

| الخطوات | درجة الحرارة | الزمن | عدد الدورات |
|---|---|---|---|
| المسخ الأولي | 95C | 5min. | 1 |
| المسخ | 95C | 5sec. | 30 |
| الارتباط | 60C | 30sec. | |
| الاستطالة | 72C | 45sec. | |
| الاستطالة النهائية | 72C | 7min. | 1 |

**3. الترحيل الكهربائي Gel electrophoresis**

تم الكشف عن نواتج التضخيم بترحيل العينات كهربائياً على هلام الاكاروز بتركيز (1.5%) لمدة (50-60) دقيقة بفرق جهد مقداره (100) فولت, وتم تقدير الأحجام الجزيئية للحزم المتكونة عن نواتج التضخيم بالمقارنة مع الحزم ذات الأوزان الجزيئية المعلومة للدليل الحجمي (100bp DNA Ladder) والمجهز من شركة (Bioneer, Korea) بعد فحص الهلام تحت الأشعة فوق البنفسجية (U.V Light) .

**3.النتائج والمناقشة :**

تم في الدراسة الحالية استئصال 224 لوزة من 112 مريض يعانون من خمج اللوزتين المزمن ومن كلا الجنسين, أعمار المرضى تراوحت من (3-40) سنة، حيث كانت 63 (56.25%) حالة من الذكور و49 (43.75%) حالة من الإناث, خلال المدة من شهر تشرين الاول 2014 ولغاية شهر أيار2015, قسمت اللوز إلى قسمين, الأول (112) لوزة تم حفظه في درجة حرارة 4- مْ لغرض إجراء تقنية الـ PCR المباشر (Direct PCR) عليها, أما القسم الأخر (112) لوزة فقد زرعت على وسط (BBEA) وتم الحصول على (30) عزلة لبكتريا *B.fragilis* بنسبة 9.23% من المجموع الكلي للعينات, والجدول (4) يوضح البكتريا التي تم عزلها من سطح ولب ولب اللوزتين لمرضى خمج اللوزتين المزمن حسب سيادتها.

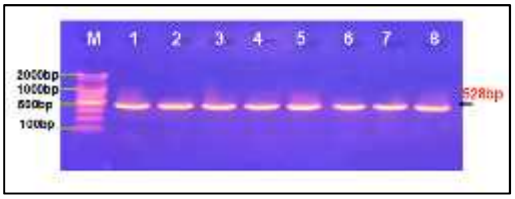
**جدول (4): البكتريا التي تم عزلها من سطح ولب اللوزتين لمرضى خمج اللوزتين المزمن حسب سيادتها .**

| نوع البكتريا | عدد العزلات من سطح اللوزة (%) | عدد العزلات من لب اللوزة (%) | العدد الكلي (سطح ولب اللوزة) % |
|---|---|---|---|
| *Staphylococcus aureus* | 27 (19.42 ) | 51 (27.41) | 78 (24) |
| *Streptococcus pyogenes* | 29 (20.86) | 36 (19.35) | 65 (20) |
| *Bacteroides fragilis* | 0 (0) | 30 (16.12) | 30 (9.23) |
| *Haemophilus influenza* | 14 (10.07) | 15 (8.06) | 29 (8.92) |
| *Staphylococcus epidermidis* | 17 (12.23) | 11 (5.91) | 28 (8.62 ) |
| *Moraxella catarrhalis* | 15 (10.79) | 7 (3.76) | 22 (6.77) |
| *Klebsiella pneumonia* | 12 (8.63) | 10 (5.37) | 22 (6.77) |
| *Streptococcus pneumonia* | 8 (5.75) | 13 (6.98) | 21 (6.46) |
| *Pseudomonas aeruginosa* | 8 (5.75) | 10 (5.37) | 18 (5.54) |
| *Viridans streptococci* | 9 (6.47) | 3 (1.61) | 12 (3.69) |
| Total | 139(100%) | 186(100%) | 325(100%) |

وقد أشار (10) أن بكتريا *B. fragilis* لها القدرة على إنتاج انزيم البيتا لاكتاميز β - Lactamase الذي يعمل على تكسير حلقة البيتالاكتام لمضادات هذه المجموعة وجعل المضاد الحيوي غير فعال , فيما كانت لدى (2) بنسبة 3.4%, وقد عزلها (13) بنسبة 17.7% , أما (1) عزلها بنسبة 2.5% .

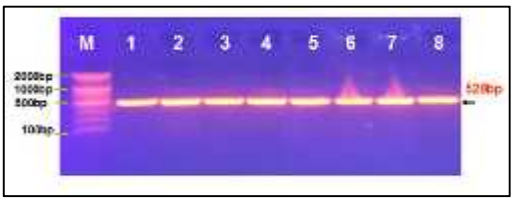
ويمكن أن يعزى سبب اختلاف نسب العزل إلى عدة أسباب منها: اختلاف أهداف الدراسة والفئات العمرية التي تعتمد عليها الدراسة, فالدراسات التي تجرى على فئة الأطفال تكون نسبة العزل فيها أكثر من غيرها, كذلك اختلاف التقنيات المستخدمة في عزل البكتريا, والتناول العشوائي للمضادات مما ينتج عنها أحياناً نتيجة زرع سالبة خاطئة, والموسم الذي يتم فيه جمع العينات يؤثر أيضاً على نسبة عزل البكتريا إذ أن بعض المواسم تكون فيه نسبة الإصابة أكثر من غيرها نظراً للظروف المناخية وحالات الازدحام, كما يمكن أن تؤثر الحالة الاقتصادية والاجتماعية للمرضى قيد الدراسة .

تم في الدراسة الحالية تأكيد تشخيص عزلات *B. fragilis* بواسطة تقنية الـ (PCR) وأظهرت النتائج الموضحة في الشكل (1) وجود الحزمة التشخيصية للجين neuraminidase (*nanH*) ذو الوزن الجزيئي(528) زوج قاعدة في جميع العزلات البالغ عددها (30)عزلة والتي أعطت نتيجة موجبة عند نموها على وسط أكَار اسكولين أملاح الصفراء للباكترويد (BBEA), أي أن تقنية الـ (PCR) كانت حساسة 100 % في تشخيص عزلات البكتريا اللاهوائية قيد الدراسة وهذه النتيجة متفقة مع (6) بأن تقنية(PCR) حساسة في تشخيص العصوانية الهشة.




شكل (1): الترحيل الكهربائي لنواتج الـ (PCR) لدنا عزلات بكتريا *B.fragilis* باستخدام بادئات متخصصة للكشف عن جين (*nanH*) التشخيصي, المسار M يمثل الدليل الحجمي (100 bp DNA Ladder) والمسار (8– 1) يمثل نواتج الـ (PCR) لدنا عزلات بكتريا *B.fragilis* حاوية على جين (*nanH*).

أما تقنية الـ Direct PCR فقد أظهرت (57) عزلة بكترية لـ *B.fragilis* كما في الشكل (2) وبنسبة 50.89 %, فيما شكلت الطرق البكتريولوجية التقليدية نسبة 26.78% من مجموع 112 لوزة وبالتالي تقنية الـ Direct PCR تقنية سريعة وحساسة وبنسبة أعلى من الطرق البكتريولوجية القياسية لتشخيص جرثومة *B.fragilis*.




شكل (2): الترحيل الكهربائي لنواتج الـ Direct PCR لدنا عزلات بكتريا *B.fragilis* باستخدام بادئات متخصصة للكشف عن جين (*nanH*) التشخيصي, بتركيز اكاروز 1.5% وبفرق جهد مقداره 100 فولت .

## 4. المصادر:


1. **AL-Juboori, A. N. and AL-Alusi, S. K. (2005). Post-Tonsillectomy Associated Bacteremia. Iraqi J. Comm. Med., 18(2).**
2. **Alnori, H. A.; Mahmod, K. A.; and Mohammed, A. A. M. (2014).Bacteriological, Serologi- cal and Histopathological Study on Tonsillectomy Specimens. JAMA, 13(2): 219-225.**
3. **Brook, I.; Yokum, P. and Shah, K.(1980). Surface versus core-tonsillar aerobic and anaerobic flora in recurrent tonsillitis. JAMA, 244(15): 1696 – 98.**
4. **Govan, A. D.; Macfarlane, P.S. and Callander, R. (1983). Pathology**

illustrated. Sheckwan Tong Ltd, New York.

5. Jawetz, E.; Melnick, J. L. and Adelberg, E. A. (2010). Medical Microbiology .25thed. McGraw-Hill.
6. Jotwani, R.; Kato, N.; Kato, H.; Watanabe, K. and Ueno, K. (1995). Detection of *Bacteroides fragilis* in Clinical Specimens by Polymerase Chain Reaction Amplification of the Neuraminidase Gene. Current Microbiology, 31: 215-219.
7. Leboffe, M. and Pierce, B. (2010). A photographic Atlas for the Microbiology Laboratory. 4th ed. USA
8. Macfaddin, J.F. (2000). Biochemical test for bacteria, 3nded.the Williams and Wilkins. London. Identification of medical Microbiology .8thed .The McGraw-Hill Companies. USA.
9. Mandell, G.L.; Douglas, G.R. and Bennett, J.E. (2000). Principles and Practice of Infectious Disease. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livings- tone, pp: 5.
10. Rajesh, Bakashi, P. and Chatterji, M.(2008). Bacterial or viral is age an indicator in acute suppurative tonsillitis. JK Science , 10:37-44.
11. Sears, C. (2009). Enterotoxigenic Bacteroides fragilis: a rogue among symbiotes. Clin Microbiol Rev, 22, 349-69.
12. Thomas, R. A. (2012). Comparative study of the core culture of the tonsils in patients having recurrent / chronic tonsillitis vs. tonsils with obstructive symptoms, in atertiary care institute. Pondicherry University, India, 114-115.
13. Verma, V.; Khurana, S.; Ram, S. and Greval, R. S. (2001). Incidence of anaerobes in throat infections and their sensitivity pattern in Ludhiana. Indian J. Med. Sci. , 55:371-5.
14. Wexler, H. (2007). Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty. Clin. Microbiol. Rev. , 20, 593-621.

# *Partial study of the neuraminidase enzyme in bacteria *Bacteroides fragilis* isolated from patients with chronic tonsillitis in the city of Al-Diwaniyah

**Hiyam Abdullah Wawi Al-Shabbani**

Collage of science

Al-Qadisiya university

**hiyamabd91@gmail.com**

**Maitham Ghaly Yousif**

Collage of science

Al-Qadisiya University

**Maitham722003@yahoo.com**

## Abstract

112 patients underwent a tonsillitis and 224 tonsil submitted during the period from October 2014 to May 2015. The patients' ages ranged from (3-40) years, 63 (56.25%) case were males and 49 (43.75%) were females. Tonsils were divided into two groups first (112) tonsil, and it was obtained 30 isolates of *Bacteroides fragilis* percentage 26.78% of the total 112 tonsil,diagnosed by bacteriological standard and technical roads polymerase chain reaction (PCR) The other group (112) has been getting it on (57) isolation of *B.fragilis* diagnosed by direct polymerase chain reaction technique (Direct PCR) and both molecular methods were using gene diagnostic (*nanH*).

The use of quality Primers in the PCR and Direct PCR techniques to investigate gene *nanH* responsible for coding for the enzyme neuraminidase, The results showed that the possession of all isolates (30) isolation of the gene *nanH* in the PCR technique, the technique of the Direct PCR showed 57 isolates which from (112) tonsil *nanH* possess the gene and thus the Direct PCR technique gave a higher proportion of roads bacteriological standard to isolate *B.fragilis*.

**Key words:** chronic tonsillitis, *Bacteroides fragilis*, neuraminidase, Direct PCR

---

* The research is a part of M.sc. thesis in the case of first researcher.