



## التحري المظهري والجزئي عن الهيمولائسين في جرثومة *Streptococcus pneumoniae*

رؤى عامر ثامر

قسم تقنيات المختبرات الطبية/ المعهد التقني الطبي/ الموصل

أميرة محمود الراوي

قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة الموصل

p-ISSN: 1608-9391

e-ISSN: 2664-2786

### Article information

Received: 23/5/2022

Accepted: 16/6/2022

DOI:

10.33899/rjs.2022.175398

corresponding author:

رؤى عامر ثامر

[mti.lec134.roaa@ntu.edu.iq](mailto:mti.lec134.roaa@ntu.edu.iq)

أميرة محمود الراوي

[amesbio5@uomosul.edu.iq](mailto:amesbio5@uomosul.edu.iq)

### الملخص

هدفت الدراسة الحالية الى التحري عن جرثومة *S.pneumoniae* التي تعد من الجراثيم الموجبة لصبغة كرام والتي تعطي تحللاً جزئياً  $\alpha$ - hemolysis على وسط اكار الدم، كما ولها القابلية على التحليل الكامل نوع (بيتا)  $\beta$ -hemolysis تحت الظروف اللاهوائية. اذ جمعت 50 عينة من عينات القشع من المرضى في مستشفى السلام وابن سينا/ في مدينة الموصل/ العراق خلال الفترة من شهر اب 2021 وحتى شهر اذار 2022 وتم عزل وتشخيص خمس عزلات لجرثومة *S.pneumoniae* والتي اظهرت القابلية على انتاج الهيمولائسين من خلال التحري عنه مظهرياً، بالإضافة الى التحري بالطرق الجزيئية عن الجين *hlys* باستخدام تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي PCR واظهرت نتائج الترحيل الكهربائي ظهور الجين ذو حجم جزئي 296 زوج قاعدي في اربعة عزلات بنسبة (80% من العزلات) واجري تفاعل البلمرة التسلسلي لتحديد تتبعها التسلسلي PCR sequencing.

**الكلمات الدالة:** *S.pneumoniae* التحلل نوع بيتا، الهيمولائسين، تفاعل سلسلة البلمرة، التحليل التتابعي.

### المقدمة

تعد جرثومة *S.pneumoniae* من الجراثيم الموجبة لصبغة كرام تظهر بشكل ثنائيات او سلاسل قصيرة غير متحركة وسالبة لاختبار الكاتاليز والاكسيديز، اختيارية لاهوائية اذ تنمو بشكل افضل عند توفير غاز CO<sub>2</sub> بنسبة 5% وتعطي تحللاً جزئياً  $\alpha$ - hemolysis على وسط اكار الدم، كما ولها القابلية على التحليل الكامل  $\beta$ -hemolysis تحت الظروف اللاهوائية وتظهر هالة رافقة حول المستعمرات في وسط اكار الدم اثر هذا النوع من التحلل لكريات الدم الحمراء (Ryan and Ray 2004). يمكن التمييز بين جرثومة *S.pneumoniae* وبقية انواع السبقيات من خلال اختبار الحساسية تجاه الاوتجين Optochin test اذ تبدي حساسية تجاه هذا الاختبار في حين ان باقي الانواع مقاومة له (Jia et al., 2022).

وصفت جرثومة *S.pneumoniae* على انها من الجراثيم المتعايشة في البلعوم الفموي في معظم الاشخاص الاصحاء حيث اشار الباحث (Hryniewicz and Sadowy (2020) الى ان جرثومة *S.pneumoniae* تنتمي الى مجموعة mitis التي تشمل انواع السبقيات المتعايشة في الانسان والتي توصف بكونها لا تتسبب بالأمراض الا نادراً فيما عدا جرثومة *S.pneumoniae* والتي تعد جرثومة انتهازية لامتلاكها عوامل فوعة تؤثر في انتشار وانتقال العدوى منسببة بأمراض خطيرة منها ذات الرئة، التهاب اغشية الدماغ، التهاب شغاف القلب وتجرحم الدم (Al-Jubory and Essa, 2022).

لُوحظ للمرة الاولى قابلية الجرثومة *S.pneumoniae* على افراز الهيموليسين واعطاء النمط التحليلي نوع  $\beta$ -hemolysis عام 1972 اذ اشار الباحث (Canvin et al., 1997) الى ان ظروف التحضين اللاهوائي تحت جرثومة *S.pneumoniae* النامية على وسط اكار الدم على التحليل نوع بيتا كما وان المضادات الحيوية والتي من شأنها تحطيم جدار الخلية الجرثومية تؤدي دورا هاما في تحرير انزيم الهيموليسين وافرازه عبر الجدار. وقد اكدت دراسة الباحثين (Tabata and Nagamue, 2021) على قابلية انواع مجموعة mitis بضمنها *S.pneumoniae* على انتاج الهيموليسين ذي القابلية التحليلية من النوع بيتا  $\beta$ -hemolysis ويطلق عليه تسمية الهيموليسين اللانمطي atypical hemolysin والذي يشابه بشكل كبير نوعين من الهيموليسين النمطي typical hemolysin (CDC و SLS) الذي تنتجه كل من جرثومة *E.coli* و *S.pyogenes*.

ينتمي  $\beta$ -hemolysin الذي تفرزه جرثومة *S.pneumoniae* الى الصنف الاول من البكتريوسينات class I وهي ببتيديات competitive peptides ذات وزن جزيئي صغير اقل من 5 ثابتة حراريا تتسبب بتنشيط الأنواع الجرثومية الاخرى لأجل الحصول على المغذيات التي يوفرها المضيف وتبرز فعاليته بتعطيل تكوين جدار الخلايا الجرثومية الاخرى او تحطيم الحمض النووي وتتفوق جرثومة *S.pneumoniae* على باقي الانواع الجرثومية المستعمرة للبلعوم الفموي في افراز هذا النوع من الببتيديات (Vogel and Spellerberg, 2021).

يُشفّر لأنتاج البكتريوسين شبيه الببتيد  $\beta$ -hemolysin في جرثومة *S.pneumoniae* من خلال المنظومة blp (Bacteriocin like peptid) والتي تحوي ما يقارب 9 جينات مسؤولة عن انتاج انواع الببتيد التنافسية competitive peptides وتُحور ما بعد الترجمة لتُفرز بشكل ببتيدي ناضج (Wholey et al., 2019) و اشار الباحث (Molloy et al., 2011) الى ان الهيموليسين يعد احد عوامل الفوعة التي تمتلكها السبقيات بشكل عام اذ ان من شأنه تحطيم خلايا الدم و لا يقتصر على كريات الدم الحمراء انما ضمن مدى واسع من التحليل لكريات الدم البيضاء بالإضافة لقابليته على التسبب بتكتل الصفائح الدموية مما يتسبب بضرر لأنسجة المضيف.

هدفت الدراسة الحالية الى التطرق إلى التحري لانزيم الهيموليسين الذي تفرزه جرثومة *S.pneumoniae* وتأكد قابلية البكتريا على التحليل من نوع  $\beta$ -hemolysis من خلال الكشف مظهرياً عن الهيموليسين وتضخيم الجين *hly* بتقنية PCR ومقارنة النتائج التسلسلي للجين *hly* بطريقة سانجر Sanger sequencing.

## المواد وطرائق العمل

### 1- جمع العينات

جُمعت 50 عينة قشع من المرضى المصابين بالتهابات الجهاز التنفسي السفلي المراجعين والراقدين في مستشفيات الموصل (مستشفى السلام، مستشفى ابن سينا) للفترة من شهر اب 2021 وحتى شهر اذار 2022 حيث استخدمت الحافظات البلاستيكية المعقمة لتجنب التلوث.

### 2- العزل والتشخيص

زرعت عينات القشع على وسط اكار الدم و اكار الدم المطبوع وحضنت بدرجة 37 م° وغاز CO<sub>2</sub> بنسبة 5% لمدة 24 ساعة، شخّصت العزلات مظهرها بالاعتماد على شكل المستعمرات النامية والفحص المجهرى (Holt *et al.*, 1994) اختبرت حساسيتها تجاه الاوبتجين optochin (Jia *et al.*, 2022)، وتأكيد التشخيص بتقنية الفايترك vitek (Książczyk *et al.*, 2016).

### التحري مظهرياً عن الانزيم بيتا هيمولايسين $\beta$ -hemolysin

اعتماداً على (Canvin *et al.*, 1997)، تم اختبار قابلية العزلات على تحليل الدم نوع بيتا باستخدام التخطيط على وسط اكار الدم 1.5 % وحضنت الاطباق لاهوائياً بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة ثم نُقلت إلى التحضين تحت الظروف الهوائية عند 6-8 درجة مئوية ولمدة 6 ساعات.

### استخلاص الحمض النووي DNA والتضخيم بتقنية تفاعل البلمرة التسلسلي PCR

استخلص الحمض النووي DNA لخمس عزلات من جرثومة *S.pneumoniae* باستخدام العدة المجهزة من قبل الشركة Geneaid تايواني المنشأ، اجري تضخيم الجين *hlys* بتقنية تفاعل البلمرة التسلسلي PCR باستخدام بوادئ متخصصة بالجين primer F(CCCGTTGTCTTGACCTTGAT) and R (AGTCCGCCAGTTACCATGAG)، مصممة اعتماداً على موقع (www.ncbi.nlm.nih.gov).

والعدة المجهزة PCR premix mastermix من قبل الشركة (Geneaid, Accupower®Profi Taq PCR Premix) والتي تحتوي على جميع متطلبات تفاعل البلمرة التسلسلي منها:

Top DNA polymerase, dNTP, Tris-HCl, pH 9, KCl MgCl<sub>2</sub> (Accupower®Profi Taq PCR Premix)

### الجدول 1: مكونات تفاعل سلسلة البلمرة واحجامها بالمايكروليتر

المكونات	الحجم بالمايكروليتر
DNA template	6
Forward primer	2
Revers primer	2
PCR water	10
PCR premix	Lypholyse
Total volume	20

تم تحضير أنابيب تفاعل PCR وفقاً لتعليمات التصنيع، ثم مزجت بالمازج ونقلت إلى جهاز طرد مركزي 300 دورة في الدقيقة لمدة 3 دقائق، وتم وضعها في جهاز PCR و (الجدول 2) يوضح الظروف المثلى لتفاعل سلسلة البلمرة PCR.

## الجدول 2: ظروف تفاعل سلسلة البلمرة PCR

Gene	Initial denaturation	No. of Cycle	Denaturation	Annealing	Extension	Final Extension
<i>hlys</i>	95°C for 4 min	30 cycles	95°C for 35 sec	58°C 1min	72°C for 1min	72°C for 7 min

فُصلت نواتج PCR باستخدام الترحيل الكهربائي بواسطة هلام الاكاروز 1% وشوهدت الحزم بعد الترحيل بواسطة جهاز الاشعة فوق البنفسجية (Han and Zhang, 2019).

## التحليل التتابعي DNA Sequencing

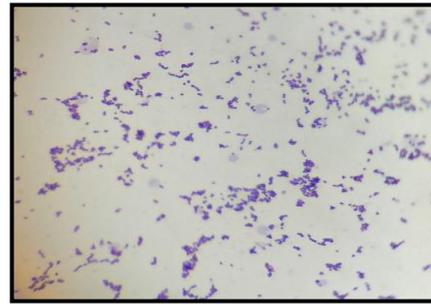
ارسلت نواتج تفاعل سلسلة البلمرة الى شركة Macrogen (Korea) لأجل تحديد التحليل التتابعي للعزلة رقم 4 بطريقة سانكر sanger sequencing، وبعد وصول النتائج تم تفسيرها من خلال الموقع العالمي للتقنيات الحياتية NCBI في برنامج BLASTA بواسطة برنامج Mega-7 واجري تحديد تغايرات الاحماض الامينية بواسطة برنامج Genes (Al-Rawi and Ali, 2011).

## النتائج والمناقشة

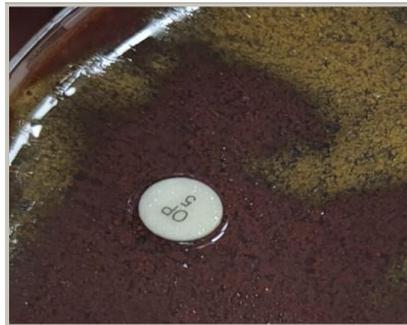
العزل والتشخيص: من إجمالي 50 عينة من القشع تم الحصول على 5 عزلات من *S.pneumoniae* 10%. هذه النسبة أعلى من نسبة عزل الجرثومة في دراسة الباحث (Keith et al., 2006) والذي حصل على عزلات بنسبة 4% فيما كانت نتيجة دراستنا أقل من النسبة التي حصل عليها (Tamimi, 2013) البالغة 11%. أظهر الفحص المجهرى للعزلات جراثيم موجبة لصبغة كرام بهيئة ثنائيات او سلاسل قصيرة كما في الصورة (1)، واطهرت نتائج الزرع على وسط اكار الدم تحللا جزئيا  $\alpha$ -hemolysis كما في الصورة (2)، ولوحظ حساسية العزلات تجاه اختبار الاوبتجين optochin الموضحة في الصورة (3).



الصورة 2: *S.pneumoniae* على وسط اكار الدم



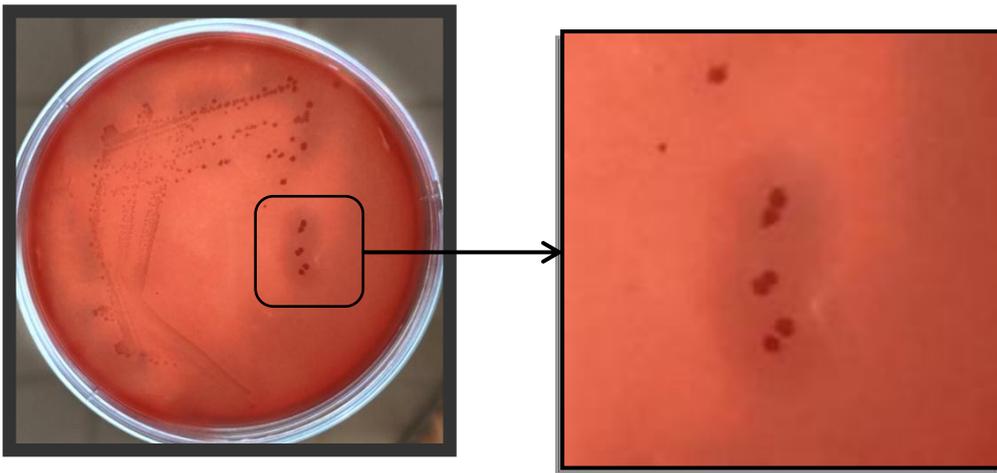
الصورة 1: *S.pneumoniae* تحت المجهر الضوئي بقوة تكبير 100 X



الصورة 3: حساسية جرثومة *S.pneumoniae* تجاه الاوبتجين

### نتائج التحري المظهري عن الهيموليسين $\beta$ -hemolysin

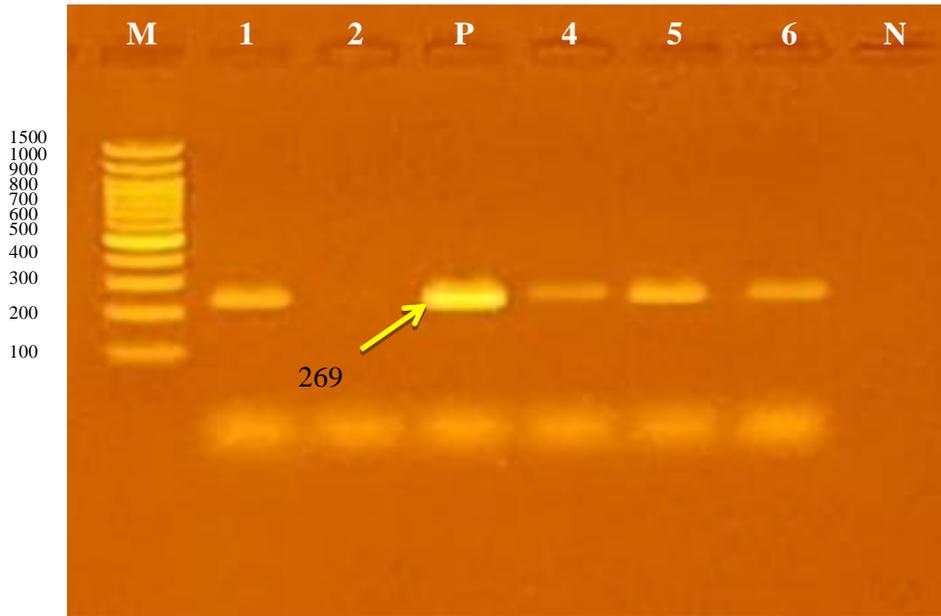
اظهرت نتائج التحري عن hemolysin like peptide لعزلات *S.pneumoniae* نتيجة ايجابية وكما في الصورة (4) وبنسبة 100% اذ تمثلت بظهور مناطق راتقة حول المستعمرات النامية في وسط اكار الدم والتحصين في ظروف لاهوائية دلالة على قابلية *S.pneumoniae* على افراز انزيم الهيموليسين والذي يؤثر في كريات الدم الحمراء في وسط اكار الدم ويتسبب بتحليلها بشكل كامل ويعطي نمطاً تحليلياً  $\beta$ -hemolysis، وافقت نتائجنا هذه ما توصل اليه الباحثان (Canvin et al., 1997) اذ اجريا تحرياً عن انزيم الهيموليسين في 7 عزلات للجرثومة *S.pneumoniae* واطهرت جميع العزلات نتائج ايجابية وبنسبة 100%، تقاربت نتائجنا من نتائج الباحثين (Tabata and Nagamue, 2021) في دراستهما على مجموعة mitis بضمنها جرثومة *S.pneumoniae* وكانت النتائج ايجابية في قابلية الجرثومة على انتاج  $\beta$ -hemolysin.



الصورة 4: نتيجة التحري عن الهيموليسين

### نتيجة التحري عن الجين *hlys* بتقنية تفاعل البلمرة التسلسلي PCR

تم تضخيم جين *hlys* عن طريق تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) باستخدام زوجين من البودائ للتضخيم. استخدم جهاز Nanodrop لقياس تراكيز الحمض النووي والتي تراوحت بين (51-112 نانوغرام / ميكرو لتر) ونقاوة مقدرة من (1.8-2). تم تضخيم جين *hlys* إلى حجم 269 زوجاً قاعدياً بالمقارنة مع الدليل الحجمي 100 زوج قاعدي. أظهرت النتائج أن 4 عزلات من 5 بنسبة (80%) تحتوي على هذا الجين الصورة (5)، توافق نتائجنا ما توصل اليه الباحث (Vogel and Spellerberg 2021) اذ اشار في دراسته الى ان جميع عزلات *S.pneumoniae* تحتوي على منظومة الجين Bacteriocin like peptid المسؤولة عن التشفير لإنتاج الببتيدات التنافسية وبنسبة 100%.



الصورة 5: نتيجة الترحيل الكهربائي لنواتج التضخيم في هلام agrose بنسبة 1 % بفولتية 65 فولط ولمدة ساعة ونصف باستخدام الدليل الحجمي DNA ladder يبدأ من 100 زوج قاعدي متمثل بالمسار M، ويمثل المسار N السيطرة السلبية، ويمثل P السيطرة الموجبة متمثلة بالعدلة ATCC 49619 *Streptococcus pneumoniae*، وباقي المسارات هي نواتج الجين التابع لعزلات *Streptococcus pneumoniae* والتي اظهرت حجم 269 زوجاً قاعدياً.

#### التحليل التتابعي للجين *hlys* والتغاير في الاليل

اظهرت نتائج التحليل التتابعي للجين *hlys* تغايراً على مستوى الاليل بالمقارنة مع 18 اليل يعود الى عزلات عالمية مسجلة و تحويراً في اربع احماض امينية ادى الى حدوث اربع طفرات على مستوى الاليل في المواقع C523089G مما ادى لطفرة صامتة silent اذ لم يحدث اي تغيير للحامض الاميني كون الكودونات GGC و GGG كلاهما يشفر للحامض الاميني الكلايسين، والتغيير في الموقع T523090C ادى لنشوء طفرة نقطية من النوع missense كون الحامض الاميني التايروسين والحامض الاميني الهستيدين لديهما تركيب كيميائي متقارب ولا يؤثر ذلك على بنية البروتين الناتج، فيما كانت الطفرة في الموقع T523265A طفرة نقطية تسببت بتحويل التشفير من الحامض الاميني السيرين الى الارجنين الا ان تأثيراً لم يظهر على البروتين المشفر ويعود ذلك الى طبيعة الاحماض الامينية والتي تنتمي الى نفس المجموعة التصنيفية، في حين كانت الطفرة في الموقع T523265C سبباً في تحويل التشفير من الحامض الاميني الميثيونين الى الحامض الاميني الثيونين ولم يظهر اي نمط مظهري للطفرة تلك لتشابه التركيب الكيميائي فيما عدا احتواء الميثيونين على الكبريت (الجدول 3).

اختلفت نتائج دراستنا مع نتائج الباحث (Miller et al., 2016) حيث أجري دراسته عن الجين المسؤول للتشفير لأنواع الببتيدات التنافسية bacteriocin like peptide واظهرت النتائج تغايراً في الاليلات في دراسته الواسعة والتي اشتملت ما يقارب 4 آلاف عذلة من العقديات الرئوية، كما واظهرت نتائج تحليل تسلسلات الاحماض الامينية وجود طفرات حذف وازدواج بما يقارب 267-1 حامض اميني.

#### الشجرة التطورية

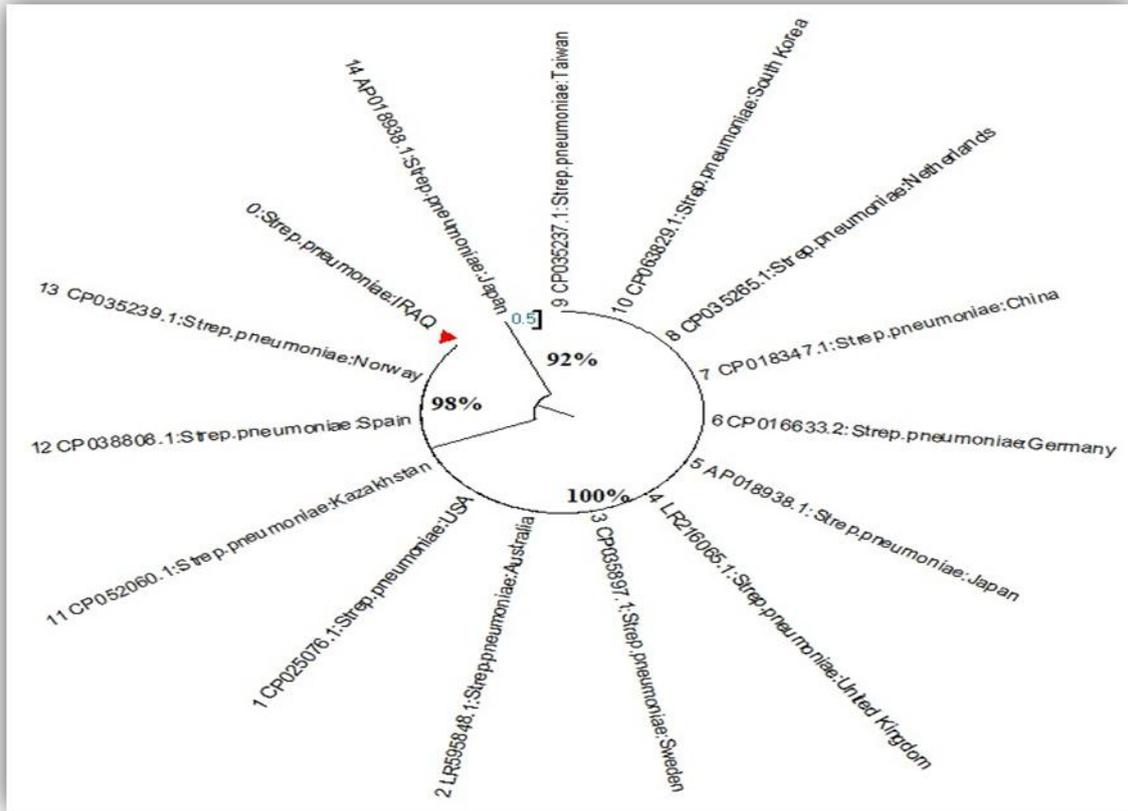
من خلال الحصول على مخطط الشجرة التطورية الموضحة في الصورة (6) يتضح ان عزلتنا *S.pneumoniae* Iraq تشابهت بنسبة 98% مع 13 عذلة من العزلات العالمية المسجلة فيما كان التشابه بين عزلتنا المحلية والعذلة القياسية *S.*

ATCC 49619 *pneumoniae* بنسبة 92%، وبما انه لم تظهر عزلتنا تطابقا بنسبة 100% على موقع NCBI مما يدل على ان عزلتنا جديدة موجودة في منطقتنا الجغرافية فقط دون الدول الاخرى.

الجدول 3: التغيرات في مواقع الاحماض الامينية والنيوكليوتيدات

Type of substitution	Location	Nucleotide	Nucleotide change	Amino acid change	Predicted effect	Sequence ID with compare	Identities
Transversion	523089	C\G	GGC\GGG	Glycine\ Glycine	Silent	ID: <a href="#">CP025076.1</a> gene=" hemolysin III "	99%
Transition	523090	T\C	TAT\CAT	Tyrosine\ Histidine	Missense		
Transversion	523260	T\A	AGT\AGA	Serine\ Arginine	Missense		
Transition	523265	T\C	ATG\ACG	Methionine\ Threonine	Missense		

Source: *Streptococcus pneumoniae*



الصورة 6: مخطط الشجرة التطورية

## المصادر

- Al-Jubory, A.; Essa, M.A. (2021). Comparison of three biofilm detection methods in coagulase negative staphylococci species. *Rafi. J. Sci.*, **30**(2), 1-15.
- Al-Rawi, A.M.; Ali, J.F. (2011). Genetic study on ampicillin resistant streptococcus pneumoniae isolated from suppurative otitis media. *Rafi. J. Sci.*, **22**(8), 35-57.
- Canvin, J.R.; Paton, J.C.; Boulnois, G.J.; Andrew, P.W.; Mitchell, T.J. (1997). *Streptococcus pneumoniae* produces a second haemolysin that is distinct from pneumolysin. *Microb. Pathogen.*, **22**(3), 129-132.
- Han, C.; Zhang, M. (2019). Genetic diversity and antigenicity analysis of *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin isolated from children with pneumococcal infection. *Internat. J. Infect. Dis.*, **86**, 57-64
- Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.T.; Williams, S.T. (1994). "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". 9<sup>th</sup> ed. Williams and Wilkins: Baltimore, Maryland; pp. 20 and 527-558
- Jia, J.; Shi, W.; Dong, F.; Meng, Q.; Yuan, L.; Chen, C.; Yao, K. (2022). Identification and molecular epidemiology of routinely determined *Streptococcus pneumoniae* with negative Quellung reaction results. *J. Clin. Laborat. Analys.*, e24293
- Keith, E.R.; Podmore, R.G.; Anderson, T.P.; Murdoch, D.R. (2006). Characteristics of *Streptococcus pseudopneumoniae* isolated from purulent sputum samples. *J. Clinical Microbiol.*, **44**(3), 923-927.
- Kim, C. H. (2020). "Ganglioside Biochemistry". Springer. New York, NY. pp. 35-53.
- Książczyk, M.; Kuczkowski, M.; Dudek, B.; Korzekwa, K.; Tobiasz, A.; Korzeniowska-Kowal, A.; Bugla-Płoskońska, G. (2016). Application of routine diagnostic procedure, VITEK 2 compact, MALDI-TOF MS, and PCR assays in identification procedure of bacterial strain with ambiguous phenotype. *Current Microbiol.*, **72**(5), 570-582.
- Miller, E.L.; Abrudan, M.I.; Roberts, I.S.; Rozen, D.E. (2016). Diverse ecological strategies are encoded by *Streptococcus pneumoniae* bacteriocin-like peptides. *Genome Biol. and Evolut.*, **8**(4), 1072-1090.
- Molloy, E.M.; Cotter, P.D.; Hill, C.; Mitchell, D.A.; Ross, R.P. (2011). Streptolysin S-like virulence factors: the continuing saga. *Nature Reviews Microbiol.*, **9**(9), 670-681.
- Ryan, K.J.; Ray, C.G. (2004). Medical Microbiology. *McGraw Hill*, **4**(370).
- Sadowy, E.; Hryniewicz, W. (2020). Identification of *Streptococcus pneumoniae* and other Mitis streptococci: importance of molecular methods. *European J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **39**(12), 2247-2256.
- Tabata, A.; Nagamune, H. (2021). Diversity of  $\beta$ - hemolysins produced by the human opportunistic streptococci. *Microbiol. and Immunol.*, **65**(11), 512-529.
- Tamimi, Z.A.H. (2013). Bacteriological and hereditary study of *Streptococcus pyogenes* isolated from patients with tonsillitis in the city of Muqadadiya. Master Thesis, College of Education for Pure Sciences \ University of Diyala.
- Vogel, V.; Spellerberg, B. (2021). Bacteriocin production by beta-hemolytic Streptococci. *Pathogens*, **10**(7), 867.
- Wholey, W.Y.; Abu-Khdeir, M.; Yu, E.A.; Siddiqui, S.; Esimai, O.; Dawid, S. (2019). Characterization of the competitive pneumonic peptides of *Streptococcus pneumoniae*. *Frontiers in Cellul. Infect. Microbiol.*, **9**, 55.
- www.ncbi.nlm.nih.gov (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).
-

## Phenotypic and Molecular Investigation of *Streptococcus pneumoniae* Hemolysin

**Roaa A. Thamer**

*Department of Medical Laboratory Technologies/ Medical Technical Institute / Mosul*

**Amera M. Al-Rawi**

*Department of Biology/ College of Science/ University of Mosul*

### ABSTRACT

The current study aimed to detect *S.pneumoniae*, which is one of the gram-positive bacteria that gives partial  $\alpha$ -hemolysis on blood agar media, as well as has the ability to complete blood hemolysis (beta)-hemolysis under anaerobic conditions. Fifty sputum specimens were collected from patients in Ibn sena and Al Salam hospitals in Mosul/ Iraq from august 2021 to March 2022. Five isolates were diagnosed as *S.pneumoniae* which exhibited an ability to produce hemolysin when phenotypically investigated. Polymerase chain reaction (PCR) technique was used to detect *hlys* gene Electrophoresis results showed four bands (80% of isolates) with a molecular size of 296 bp the PCR product were then sequenced.

**Keywords:** *S.pneumoniae*, hemolysin like peptide,  $\beta$ -hemolytic, PCR sequencing.