**Rafidain Journal of Science**
https://rsci.mosuljournals.com

**Vol. 31, No. 3, pp.1-9, 2022**

# التحري المظهري والجزيئي عن الهيمولايسين 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
**أميرة محمود الراوي**
amesbio5@uomosul.edu.iq

**الملخص**

هدفت الدراسة الحالية الى التحري عن جرثومة *S.pneumoniae* التي تعد من الجراثيم الموجبة لصبغة كرام والتي تعطي تحللا جزئياً α- hemolysis على وسط اكار الدم، كما ولها القابلية على التحليل الكامل نوع (بيتا) β-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 الهيمولايسين 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 جزيئي 296 زوج قاعدي في اربعة عزلات بنسبة (80% من العزلات) واجري تفاعل البلمرة التسلسلي لتحديد تتابعها التسلسلي PCR sequencing.

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

This is an open access article under the CC BY 4.0 license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/ ).

**المقدمة**

تعد جرثومة *S.pneumoniae* من الجراثيم الموجبة لصبغة كرام تظهر بشكل ثنائيات او سلاسل قصيرة غير متحركة وسالبة لاختبار الكاتاليز والاوكسيديز، اختيارية لاهوائية اذ تنمو بشكل افضل عند توفير غاز $CO_2$ بنسبة 5% وتعطي تحللا جزئياً α- hemolysis على وسط اكار الدم، كما ولها القابلية على التحليل الكامل β-hemolysis تحت الظروف اللاهوائية وتظهر هالة رائقة 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 السبحيات من خلال اختبار الحساسية تجاه الاوبتجين 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 السبحيات 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 متسببة بأمراض خطيرة منها ذات الرئة، التهاب اغشية الدماغ، التهاب شغاف القلب وتجرثم الدم (Al-Jubory and Essa, 2022).

لُوحظ للمرة الاولى قابلية الجرثومة *S.pneumoniae* على افراز الهيمولايسين واعطاء النمط التحليلي نوع β-hemolysis عام 1972 اذ اشار الباحث (Canvin *et al.*, 1997) الى ان ظروف التحضين اللاهوائي تحث 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 الهيمولايسين وافرازه عبر الجدار. وقد اكدت دراسة الباحثين (Tabata and Nagamue, 2021) على قابلية انواع مجموعة mitis بضمنها *S.pneumoniae* على انتاج الهيمولايسين ذي القابلية التحليلية من النوع بيتا β-hemolysis ويطلق عليه تسمية الهيمولايسين اللانمطي atypical hemolysin والذي يشابه بشكل كبير نوعين من الهيمولايسين النمطي typical hemolysin (CDC و SLS) الذي تنتجه كل من جرثومة *E.coli* و *S.pyogenes*.

ينتمي β-hemolysin الذي تفرزه جرثومة *S.pneumoniae* الى الصنف الاول من البكتريوسينات class I وهي ببتيدات competitive peptides ذات وزن جزيئي صغير اقل من 5 ثابتة حراريا تتسبب بتثبيط 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 الببتيدات Vogel and Spellerberg, (2021).

يُشفر لأنتاج البكتريوسين شبيه الببتيد β-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 ببتيد ناضج (Wholey *et al.*,2019) واشار الباحث (Molloy *et al.*, 2011) الى ان الهيمولايسين يعد احد عوامل الفوعة التي تمتلكها السبحيات 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 الصفيحات الدموية مما يتسبب بضرر لأنسجة المضيف.

هدفت الدراسة الحالية الى التطرق إلى التحري لانزيم الهيمولايسين الذي تفرزه جرثومة *S.pneumoniae* وتأكيد قابلية البكتريا على التحليل من نوع β-hemolysis من خلال الكشف مظهرياً عن الهيمولايسين وتضخيم الجين *hly* بتقنية PCR ومقارنة التتابع 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 واكار الدم المطبوخ وحضنت بدرجة 37 مْ وغاز $CO_2$ بنسبة 5% لمدة 24 ساعة، شخصت العزلات مظهريا بالاعتماد على شكل المستعمرات النامية والفحص المجهري (Holt *et al.*, 1994) اختبرت حساسيتها تجاه الاوبتجين optochin (Jia *et al.*, 2022 )، وتأكيد التشخيص بتقنية الفايتيك vitek (Książczyk *et al.*, 2016).

**التحري مظهريًا عن الانزيم بيتا هيمولايسين β-hemolysin**

اعتمادًا 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 مْ 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 قِبل 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 MgCl2 (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 وفقًا 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 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *hlys* | 95C° for 4 min | 30 cycles | 95C° for 35 sec | 58C° 1min | 72C° for 1min | 72C° for 7 min |

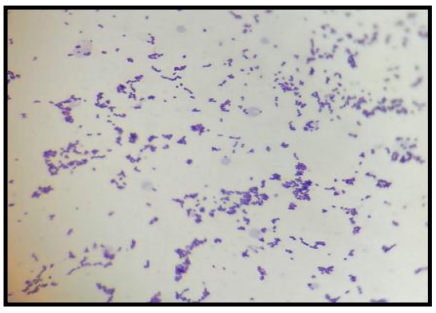
فُصلت نواتج PCR باستخدام الترحيل الكهربائي بواسطة هلام الاكاروز 1% وشوهدت الحزم بعد الترحيل بواسطة جهاز الاشعة فوق البنفسجية (Han and Zhang, 2019).

**التحليل التتابعي DNA Sequencing**

ارسلت نواتج تفاعل سلسلة البلمرة الى شركة Macrogene (Korea) لأجل تحديد التحليل التتابعي للعزلة رقم4 بطريقة سانكر sanger sequencing، وبعد وصول النتائج تم تفسيرها من خلال الموقع العالمي للتقنات الحياتية NCBI في برنامج BLASTA بواسطة برنامج Mega-7 واجري تحديد تغايرات الاحماض الامينية بواسطة برنامج Genes (Al-Rawi and Ali, 2011).

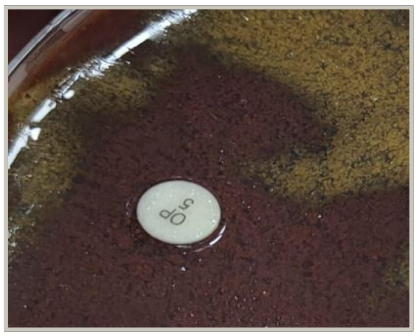
**النتائج والمناقشة**

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 المجهري للعزلات جراثيم موجبة لصبغة كرام بهيئة ثنائيات او سلاسل قصيرة كما في الصورة (1)، واظهرت نتائج الزرع على وسط اكار الدم تحللا جزئيا α-hemolysis كما في الصورة (2)، ولوحظ حساسية العزلات تجاه اختبار الاوبتجين optochin الموضحة في الصورة (3).



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

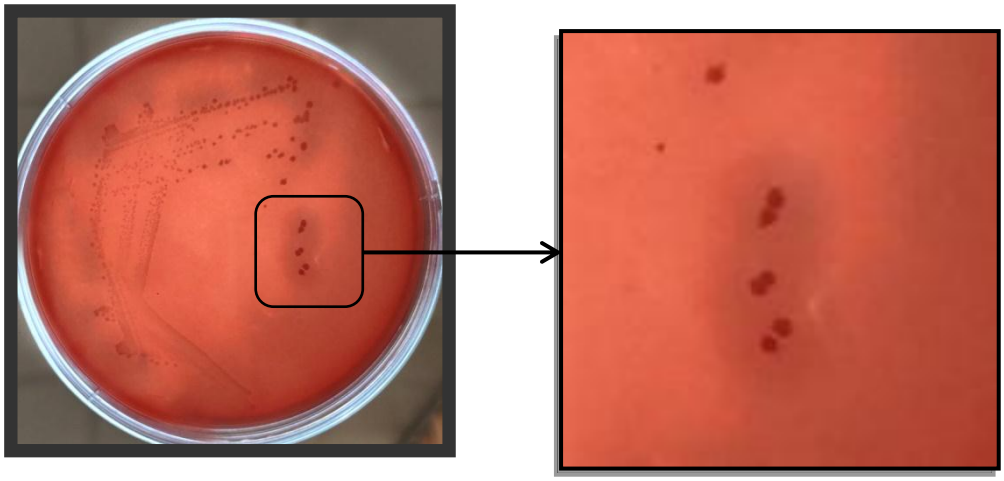
**الصورة 2: *S.pneumoniae* على وسط اكار الدم**



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

**نتائج التحري المظهري عن الهيمولايسين β-hemolysin**

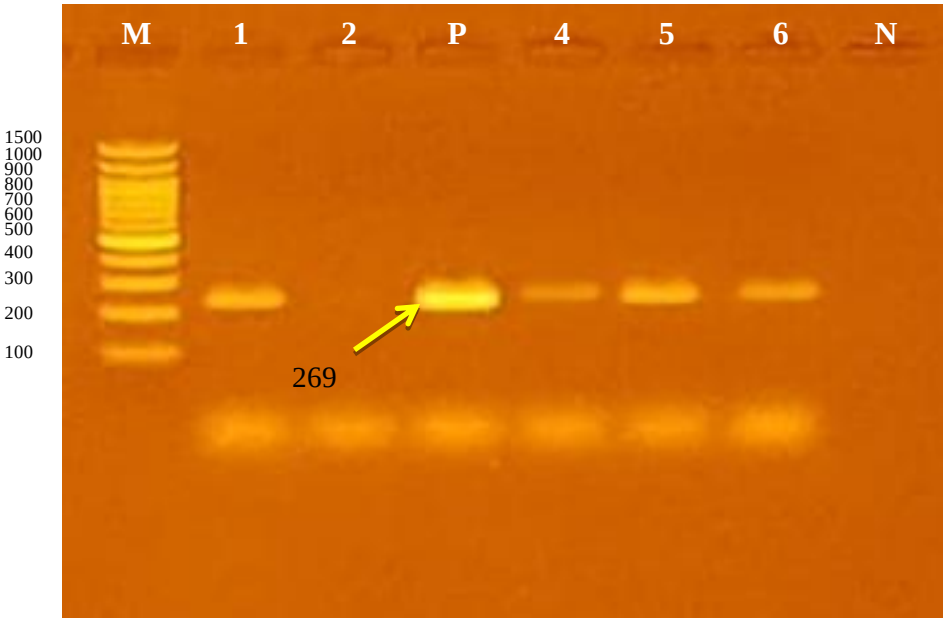
اظهرت نتائج التحري عن hemolysin like peptide لعزلات *S.pneumoniae* نتيجة ايجابية وكما في الصورة (4) وبنسبة 100% اذ تمثلت بظهور مناطق رائقة حول المستعمرات النامية في وسط اكار الدم والتحضين في ظروف لاهوائية دلالة على قابلية *S.pneumoniae* على افراز انزيم الهيمولايسين والذي يؤثر في كريات الدم الحمراء في وسط اكار الدم ويتسبب بتحليلها بشكل كامل ويعطي نمطاً تحليلا β-hemolysis، وافقت نتائجنا هذه ما توصل اليه الباحثان (Canvin *et al*., 1997) اذ اجريا تحرياً عن انزيم الهيمولايسين في 7 عزلات للجرثومة *S.pneumoniae* واظهرت 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 β-hemolysin.



**الصورة 4: نتيجة التحري عن الهيمولايسين**

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

تم تضخيم جين *hlys* عن طريق تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) باستخدام زوجين من البوادئ للتضخيم. استخدم جهاز Nanodrop لقياس تراكيز الحمض النووي والتي تراوحت بين (51–112 نانوغرام / ميكرولتر) ونقاوة مقدرة من (1.8–2). تم تضخيم جين *hlys* إلى حجم 269 زوجًا قاعديًا بالمقارنة مع الدليل الحجمي100 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 بالعزلة *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619، وباقي المسارات هي نواتج الجين التابع لعزلات *Streptococcus pneumoniae* والتي اظهرت حجم 269 زوجًا قاعديًا.**

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

اظهرت نتائج التحليل التتابعي للجين ***hlys*** تغايرا 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 الهستدين لديهما تركيب كيميائي متقارب ولا يؤثر ذلك على بنية البروتين الناتج، فيما كانت الطفرة في الموقع T523265A طفرة نقطية تسببت بتحوير 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 تحوير التشفير من الحامض الاميني المثيونين الى الحامض الاميني الثريونين ولم يظهر اي نمط مظهري للطفرة تلك لتشابه التركيب الكيميائي فيما عدا احتواء المثيونين 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 تغايرا في الاليلات في دراسته الواسعة والتي اشتملت ما يقارب 4 آلاف عزلة من العقديات الرئوية، كما واظهرت نتائج تحليل تسلسلات الاحماض الامينية وجود طفرات حذف واضافة بما يقارب 1–267 حامض اميني.

**الشجرة التطورية**

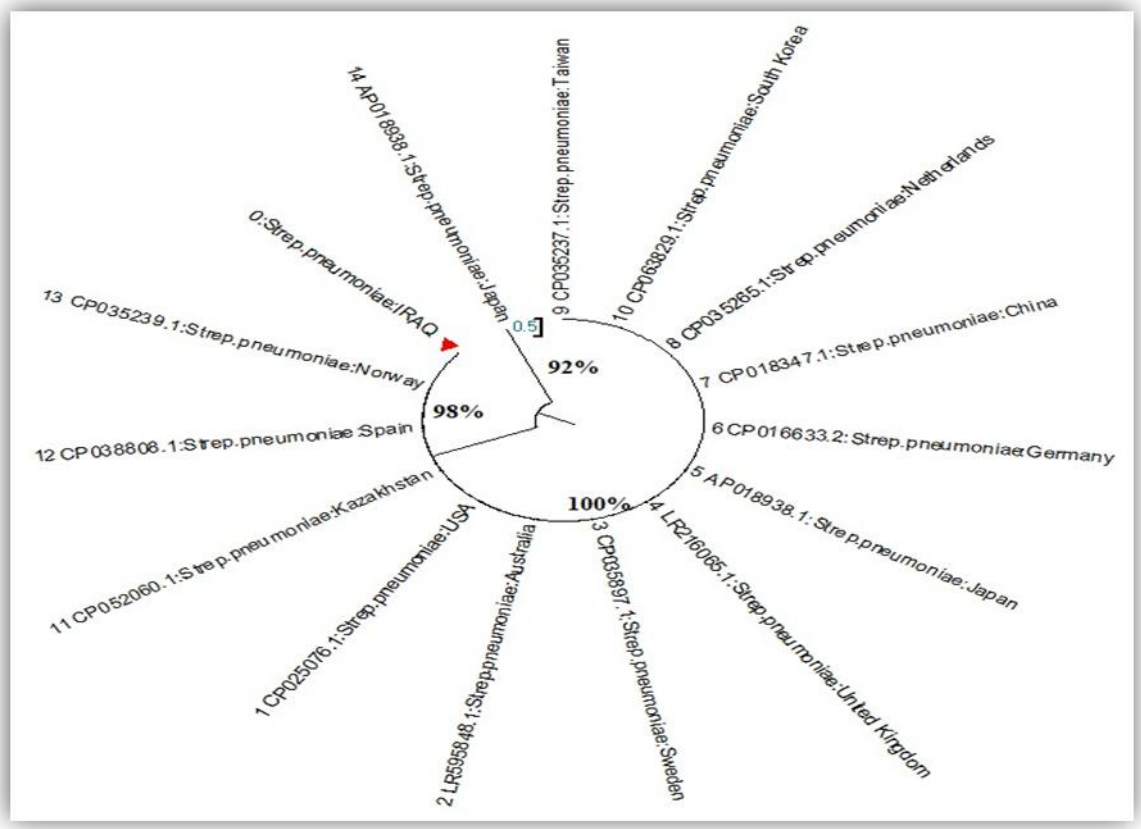
من خلال الحصول على مخطط الشجرة التطورية الموضحة في الصورة (6) يتضح ان عزلتنا *S.pneumoniae* Iraq تشابهت بنسبة 98%مع 13 عزلة من العزلات العالمية المسجلة فيما كان التشابه بين عزلتنا المحلية والعزلة القياسية *S.*

*pneumoniae* 49619 ATCC 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: التغاير 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: CP025076.1 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". 9th 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 sag A. *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 β- 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 Muqdadiya. 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 α-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, β-hemolytic, PCR sequencing.