التشخيص الجزيئي والتحري عن جين الضراوة *rmp* لبكتريا *Neisseria gonorrhoeae* المعزولة من المرضى العراقيين

مهند كريم عنيد* و نورية عبد الحسين علي**
معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الإحيائية للدراسات العليا، جامعة بغداد.

الخلاصة

تضمنت الدراسة جمع 80 عينة سريرية من مرضى مشكوك بأصابتهم بمرض السيلان (تضمنت عينة ادرار ومسحتان مباشرة من كل مريض) من مناطق بغداد المختلفة ومنطقة الكوت والصويرة والمختبرات الاهلية وعيادات الاطباء الخاصة، للمدة الواقعة بين تشرين الثاني/2011- حزيران/2012، تم تشخيص الاصابة بالمكورات البنية من خلال إيجاد بكتيريا النيسريا البنية (*Neisseriagonorrhoeae*) في العينات باستخدام كل أساليب الفحص المجهري والزرع على الاوساط الزرعية على العينات البالغة 80 عينة وشملت 17 (21.25%) عينة من النساء و63 (78.75%) عينة من الرجال. اظهرت نتائج الفحص المجهري و الزرع أن هناك(58.75 % 47) عينة موجبة من مجموع العينات الكلي البالغ 80 عينة، اذ تم تحديد الاصابة لـ (43.75 35%) عينة عن طريق الفحص المجهري والزرع على وسط اكار الجكليت ووسط النسيريا ووسط ثاير- مارتن المحور، وتم تحديد 9 (% 11.25) عينة بالفحص المجهري لوحده (لم تنمو على الاوساط الزرعية) و 3 (3.75%) عينة من الزرع على الاوساط الزرعية وحدها (الفحص المجهري كان سلبيا). اظهرت نتائج التشخيص الوراثي للتحري عن البكتيريا المسببة لمرض السيلان بأستعمال بوادئ متخصصة للجين ***rmp*** المصممة في هذه الدراسة عن وجود 77 (96.25 %) عينة اعطت نتيجة موجبة للمسحات المباشرة و 75 (93.75%) عينة اعطت نتيجة موجبة لعينات الادرار.

المقدمة

تعد بكتيريا *Neisseria gonorrhoaea* من الممرضات الانتهازية والمجبرة المعيشة في الانسان فقط و تسمى النسيريا البنية او المكورات البنية وهي عبارة عن مكورات سالبة لصبغة غرام وذات شكل كلوي ثنائية [1] وهي السبب الرئيسي للعدوى المنقولة جنسيا في جميع انحاء العالم ومسببة مرض السيلان (gonorrhoea) [2].

مرض السيلان من الأمراض كثيرة الإنتشار في العالم ويعدّ من أكثر الأمراض المعدية والمتوطنة المسببة للاوبئة واهم العوامل التي تجعل هذا المرض يسبب اوبئة هي فترة حضانة الجرثومة القصير مع قابليتها للانتقال من شخص مصاب الى اخر سليم عن طريق الجهاز التناسلي. يأتي حدوث السيلان في الولايات المتحدة في المركز الثاني بالنسبة للكلاميديا بين الأمراض الجرثومية المنقولة جنسيا ويقدر الآن عدد الحالات الجديدة أكثر من 82 مليون شخص سنويا [٣].

الاشخاص الذين يعانون من الاصابة بمرض السيلان يكونون اكثر عرضة او اكثر حساسية للاصابة بعدوى فايروس نقص المناعة البشري (الايدز) وتقدر نسبة خطر الاصابة بهذا المرض 3.5–9 % [٤]. واصبح معدل انتشار العدوى بالنسيريا البنية غير المشخصة او غير المعالجة عالية لذلك التشخيص الدقيق للالتهابات عديمة الاعراض امر ضروري [٥].

يعتمد انتشار المرض ووبائيته على نوع العلاقات الاجتماعية بين البشر وترتبط ارتباطا وثيقا بطريقة انتقاله حيث ينتقل المرض عن طريق الاتصال الجنسي لذا ازدادت اهمية دراسته من الناحية المرضية والمناعية وايضا يعتمد انتشاره على بعض الحوادث مثل الحروب والهجرة بين المناطق الموبؤة وانتشار الفقر [6].

التشخيص المبكر والعلاج ضروري لمنع حصول ضرر دائم للمريض بالاضافة الى ذلك فان انتشار السلالات المقاومة لمضادات الحيوية اصبحت مصدر قلق متزايد وعدم وجود علاج فعال قد يصبح قريبا [٧،٨، ٩،١٠، ١١، ١٢]. أضافة الى انها تتكيف بشكل جيد للنمو على مجموعة متنوعة من السطوح المخاطية للمسالك

البولية والتناسلية التي هي في الغالب موقع استعمار الخلايا البكتيريا البنية [١٣] وان كانت هناك اصابات قد تحدث في المستقيم وملتحمة العين والبلعوم [١٤،١٥].

التشخيص عن طريق زراعة المكورات البنية ذات حساسية منخفضة جدا وتستهلك وقت طويل لانه لايمكن ان تعيش النسيريا البنية طويلا خارج الجسم وذلك لحساسيتها لظروف النمو [٢]. من ناحية اخرى يمكن الحصول على نتائج ايجابية كاذبة من الاختبارات الكيمياء الحيوية الخاصة بالنسيريا نتيجة لتداخلها لسلالات النسيريا الاخرى مثل *N.subflava, N.cinerea, N.flarescens, N.sicca, N.lactamica,* و *Lactobacillus species* [١٦] او الكشف الجزيئي مثلا باستخدام الجين *porA* pseudogene. التي لا تزال تشكل تحديا لأساليب الكشف الجزيئي [17]. وعليه هدفت الدراسة الحالية استخدام الاختبارات الجزيئية مثل التضخيم الجزيئي polymerase chain reaction (PCR) في الكشف عن جين الظراوة *rmp*. يشفرهذا الجين الى بروتين يسمى البروتين الثالث Protein III وهو واحد من البروتينات الاخرى في الغشاء الخارجي للنيسيريا البنية وايضا تسمى بروتينات الإختزال المتحورة (Reduction–modifiable Proteins) وزنها الجزيئي نحو 33 كليو دالتون توجد في سلالات النيسيريا البنية جميعها. البروتين Protein III ثابت مستضدياً (Antigenically) في المكورات البنية جميعها ولا تخضع الى التغايرات المستضدية، تكَون هذه البروتينات معقداً مع Por وLOS. يحث بروتين Protein III على تكوين الاجسام المضادة (Antibodies) في حالة الإصابة بالمكورات البنية أو ببكتيريا *Escherichia coli* وعند وجود هذه الأجسام المناعية في الدم فإنها تقوم بالإتحاد مع أجزاء البروتين المعرض وتغلق أماكن آتحاد الأجسام المناعية الخاصة بقتل البكتيريا، لذا تسمى الأجسام المناعية ضد هذا النوع من البروتينات بآسم الأجسام المناعية الحاجبة (blocking antibodies).

مواد وطرائق العمل

جمع العينات

جمعت 80 عينة من المرضى المصابين بالسيلان من مناطق مختلفة (بغداد والكوت والصويرة) إذ أُخذ من كل مريض عينة أدرار ومسحتين، من العيادات الخاصة والمختبرات الأهلية وأُخذت المعلومات الأتية الجنس والعمر والحالة الاجتماعية ومستوى التعليم والحالة الإقتصادية لكل مريض للمدة بين كانون الأول 2011 الى حزيران 2012.

عزل بكتيريا النيسيريا

زرعت العينات مباشرة بعد جمعها على وسط Thayer Martin Agar modified وكذلك وسط GC agar لغرض تنشيطها، وحضنت بدرجة 37 مئوية لمدة 24 ساعة وفي الوقت نفسه زرعت على وسط Chocolate medium كونه وسطا إنتقائيا يسمح بنمو البكتريا السالبة لصبغة كرام، وكذلك فهو وسط تفريقي يمكن بواسطته التفريق بين البكتيريا المخمرة وغيرالمخمرة لسكر اللاكتوز، وحضنت لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 مئوية ونقلت المستعمرات التي تميزت بلونها الرمادي الى طبق آخر يحتوي نفس الوسط لغرض تنقيتها، واستمرت اعادة الزرع على هذا الوسط الى ان تم الحصول على مستعمرات نقية.

تشخيص العزلات البكتيرية

شخصت العزلات البكتيرية اعتماداً على الصفات الزرعية والمجهرية والاختبارات الكيموحيوية واعتمادا على ما ورد في [١٨] وكما يأتي:

الصفات الزرعية العامة

شخصت البكتيريا مبدئياً من خلال دراسة الصفات الزرعية العامة للمستعمرات النامية على الاوساط الزرعية، بعدها تمت دراسة أشكال المستعمرات الظاهرة وحددت على أساس اللون والشكل والحجم فضلاً عن ملاحظة الصفات العامة الأخرى مثل تخمر اللاكتوز من عدمه.

الصفات المجهرية

أجري الفحص المجهري للخلايا البكتيرية من خلال تصبيغها بصبغة غرام وفحصها تحت العدسة الزيتية للمجهر الضوئي.

الفحوص الكيموحيوية (Biochemical Tests)

استعملت عدد من الفحوصات الكيموحيوية التشخيصية اعتماداً على كل من [١٩،٢٠] وهي :

A- اختبار إنتاج أنزيم الكتاليز (Catalase test)

B- فحص الاوكسيديز (Oxidase test)

C- اختبار تخمر السكريات (الكلوكوز واللاكتوز والسكروز والمالتوز)

استخلاص الحمض النووي DNA (DNA extraction)

تم الاستخلاص باستعمال عدة الاستخلاص المجهزة من شركة (Geneaid) واعتمادا على تعليمات الشركة المصنعة تمت عملية استخلاص الحمض النووي DNA من الخلايا البكتيرية السالبة لصبغة كرام التي تم تشخيصها مسبقا والخلايا البكتيرية المعلقة بالمحلول الفسلجيمن الادرار او المسحات المباشرة [٢١].

تحضير هلام الاكاروز

حضر الهلام حسب ماذكره [٢٢] بأذابة 2غرام من الاكاروز في 100 مليلتر من محلول دارىء TBE (1x) المحضر مسبقا، سخن الاكاروز الى درجة الغليان لحين أكمال ذوبان الهلام بعدها ترك ليبرد بدرجة 45-50 مئوية ثم أضيف مقدار 2 مايكروليتر من صبغة بروميد الاثيديوم بتركيز نهائي 0.5 مايكروغرام/ مليلتر. تم صب الهلام في قالب الصب اذ حضرت صفيحة اسناد الاكاروز بعد أن ثبت المشط لتكوين الحفر المعدة لتحميل العينات. صب هلام الاكاروز بهدوء في الصفيحة لمنع حدوث فقاعات هوائية وترك ليتصلب لمدة 30 دقيقة. رفع المشط بهدوء من الأكاروز المتصلب. ثبتت الصفيحة على مسندها في وحدة الترحيل الكهربائي الافقية المتمثلة بالحوض المستخدم للترحيل الكهربائي. ملئ الحوض بدارئ TBE، بحيث يغطي سطح الهلام.

تشخيص بكتيريا السيلان *Neisseria gonorrhoeae*

تم تشخيص البكتيريا بواسطة تفاعل PCR وذلك بأستخدام البادئ (Primer) المصمم للجين ***rmp*** ويتكون مزيج التفاعل كما في الجدول (1):

جدول (١)

مزيج التفاعل الخاص لتشخيص الجين *rmp*.

***rmp* gene**	
المكونات	**الحجم بالمايكرولتر**
للجين البادئ الامامي *rmp*	1
البادئ العكسي للجين *rmp*	1
DNA	3
ماء مقطر خال من الايونات	15
Accu Power® PCR Premix	
الحجم النهائي	**20**

وضبطت الظروف المثلى لتنفيذ تقنية PCR كما في الجدول (2):

جدول (٢)

الظروف المثلى للكشف عن الجين *rmp*.

التسلسل	المرحلة	درجة الحرارة المئوية	الوقت	عدد الدورات
1.	الاولي DNA مرحلة المسخ	94 °C	3 دقائق	دورة واحدة
2.	مسخ DNA	94 °C	30 ثانية	38 دورة
3.	الألتحام	66 °C	30 ثانية	
4.	الأستطالة	72 °C	40 ثانية	
5.	مرحلة الاستطالة النهائية	72 °C	7 دقائق	دورة واحدة

البوادئ المستخدمة في التفاعل .

البادئ المتخصص بالجين *rmp* المصصم من قبل الباحثين.

البادئ	التسلسل	درجة الانصهار Tm (c^o)	النسبة المئوية GC(%)	حجم الناتج
الامامي	5′-GTCCGCGTCGAAGGCCATAC-3′	61.1	65.0	267 زوج قاعدة
العكسي	5′-CACATCTACGCGGCGGTCAG-3′	61.0	65.0	

النتائج والمناقشة

العزل

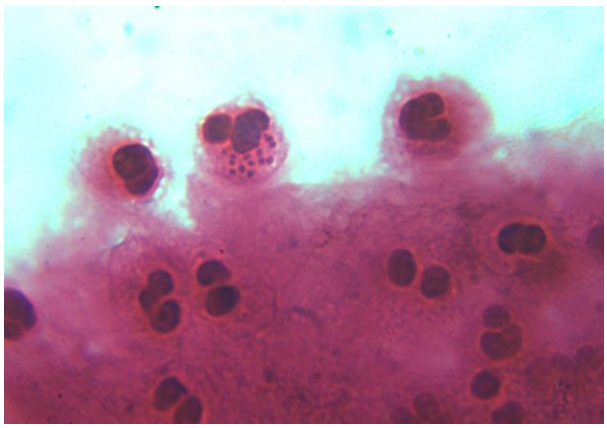
أظهرت نتائج الزرع الأولي أن هناك 38 عزلة من مجموع العينات الكلي البالغ 80 عينة أعطت صفات مستعمرات بكتيريا *Neisseria gonorrhoeae* حيث استطاعت النموعلى وسط اكارالجكليت (chocolateagar) ووسط النسيريا (GC agar) ووسط ثاير– مارتن المحور (modified Thayer martein agar) وخمرت سكر الكلوكوز فيه، وأعطت مستعمرات صغيرة رمادية اللون او لؤلؤية شفافة (glistening) ذات حافات مرتفعة عن الوسط (raised) والمستعمرات تشبه قطرات الندى (dew-dropcolonies) (الشكل1) وقد اشار Janda *et al.* [٢٣] الى شكل المستعمرات وكانت مطابقة تماما الى شكل المستعمرات في هذا البحث.

الشكل (1) المستعمرات البنية لبكتيريا النسيريا على وسط الثاير– مارتن اكار.

الفحص ألمجهري

أعطت نتائج الفحص المجهري للشرائح المحضرة والبالغ عددها 44 (55%) عينة من مجموع العينات الكلي بعد تصبيغها بصبغة كرام حيث تظهر الخلايا تحت المجهر مكورات ثنائية سالبة لصبغة كرام وبشكل كلوي وتدعى Gram negative interacellular diplococcic (G.I.N.D) داخل خلايا الكريات البيض متعددة النوى (PMNs) وقد اشار كل من [24] Cheesbrough [26] Iser *et al.* Haddow *et al.* [25] و Vesic *et al.*[27]

الى شكل خلايا البكتيريا وتواجدها داخل خلايا الكريات البيض متعددة النوى (PMNs). وقد اشار Elizabeth *et al.* [٢٨] على الرغم امتلاك (PMNs) ترسانة قوية مضادة للبكتيريا عن طريق اليات القتل المتعددة الا ان المكورات البنية لها القدرة على البقاء حية داخل هذه الخلايا والذي يشير الى تطور المكورات البنية. ومن صعوبات تشخيص البكتيريا مجهرياً هوعدم وضوحها داخل عينات تحتوي على اعداد كبيرة من خلايا الكريات البيض متعددة النوى (PMNs) (الشكل a-2) بينما يمكن تشخيصها بسهولة في عينات تحتوي على اعداد اقل من (PMNs) (الشكل b-2). مع ذلك فإن هذه الطريقة غير حساسة نسبيا ولا توفر التشخيص النهائي لعينات من الرجال الذين ليس لديهم أعراض والنساء والاصابات خارج الأعضاء التناسلية وهذا ما اشار اليه [١٨] Bignell وكذلك [٢٩] Workowski and Berman أذ اكدوا الى امكانية قبول التشخيص النهائي باستخدام المجهر الضوئي في الاصابات ذات الاعراض وعدم قبول التشخيص في حالات النساء والمصابين بدون اعراض وهذه المصادر مطابقة لنتائج هذه الدراسة حيث امكانية التشخيص المباشرللمصابين الذين لديهم اعراض وعدم ظهور نتائج ايجابية في حالات المصابين من النساء او الرجال الذين ليس لديم اعراض.



الشكل (a-٢) بكتيريا *N.gonorrhoeae* تم صبغها بصبغة غرام تحت المجهرالضوئي في عينة تحتوي على اعداد كبيرة من (Polymorphonuclear cells) (قوة التكبير 1000).

الشكل (b- 2) بكتيريا *N.gonorrhoeae* تم صبغها بصبغة غرام تحت المجهرالضوئي في عينة تحتوي على عداد قليلة من (Polymorphonuclear cells) (قوة التكبير 1000).

التشخيص الكيميائي الحياتي

خضعت جميع العزلات التي أظهرت صفات زرعية ومجهرية مطابقة لصفات *Neisseria gonorrhoeae* والبالغ عددها 38 عزلة الى الاختبارات الكيموحيوية لتاكيد التشخيص، ويبين الجدول (٣) الفحوصات الكيميائية الحيوية التي اعتُمدت بتشخيص أنواع بكتريا *N.gonorrhoeae* وفقا لما جاء في Janda and Knap [19] و Lai-King [20] and Irene ويتبين من النتائج التي تم الحصول عليها ان الأنواع البكتيرية التابعة *N.gonorrhoeae* مطابقة للصفات التشخيصية العالمية وحسب Todar [30]، إذ أعطت جميع عزلات *N.gonorrhoeae*. نتيجة موجبة لفحص الأوكسديز وسبب ذلك أن عزلات *N.gonorrhoeae* تتميز بوجود مستقبل طرفي إلى O_2 مثل سايتوكروم C والتي تستخدم الاوكسجين لانتاج الطاقة، بينما أعطت نتيجة موجبة في فحص الكاتاليز بدليل ظهور فقاعات هوائية من O_2 الناتجة بفعل أنزيم الكاتاليز المسؤول عن تحويل بيروكسيد الهيدروجين إلى O_2 و H_2O و أعطت العزلات نتيجة سالبة في فحص إنتاج أنزيم اليوريز لعدم قدرتها على إنتاج أنزيم اليوريز الذي يحلل اليوريا إلى أمونيا ولم تغير اللون الأصفر للوسط، وعند اجراء فحص الحركة بطعن الوسط شبه الصلب لوحظ في جميع العزلات عدم إنتشار النمو خارج حدود الطعنة دلالة على أنها غير متحركة.

جدول (٣)

الاختبارات الكيميائية الحيوية المميزة لبكتيريا Neisseria gonorrhoeae.

الاختبارات	*Neisseria gonorrhoeae*
صبغة غرام	–
كاتليز	+
اوكسيديز	+
تحلل اليوريز	–
الحركة	–
الكلكوز	+
المالتوز	–
الفركتوز	–
السكروز	–
لاكتوز	–

مما تقدم يظهران التشخيص بالطرق التقليدية المتضمنة الاختبارات الكيميائية الحيوية هي طرق بطيئة ومتعبة اضافة الى ان الاختبارات الكيميائية الحيوية تأخذ حيزاً كبيراً لكثرة الاوساط والكواشف التفريقية قد يرهق العامل بالمختبر خاصة اذا كان عدد العينات المطلوب تشخيصها كثيراً بالاضافة الى انها قد تؤدي الى خسارة العينة لاسباب عدة منها تعرض العينة للتلوث لعدم توافر ظروف معقمة وأنتهاء صلاحية المواد و يحتاج التشخيص بالطرق التقليدية الى دقة وتركيز عاليين وخبرة وقد يعتمد التشخيص على الرأي الشخصي للعامل [٣١] Turton *et al*.

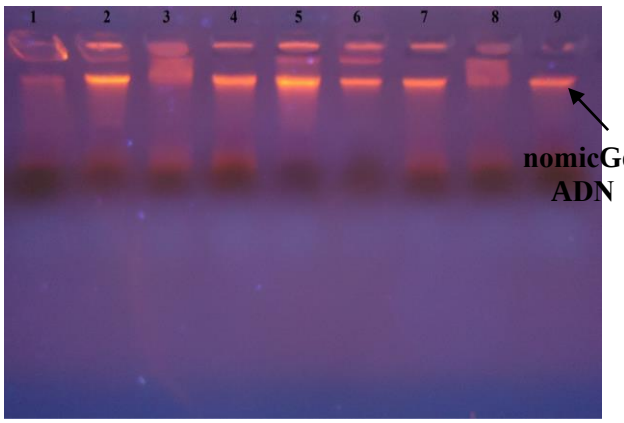
التشخيص الوراثي

استخلاص الحامض النووي DNA

تم استخلاص الحامض النووي DNA من عزلات بكتيريا *N.gonorrhoeae* باستعمال عدة الاستخلاص المجهزة من شركة Geneied واستغرق الوقت من 24 الى 72 ساعة. نميت العزلات اولا على وسط الجكليت لأعادة أنعاش العزلات والحصول على غزارة بالنمو ثم لقح وسط مرق نقيع القلب والدماغ بهذه العزلات أذ استخدم هذا الوسط بدلاً من وسط Luria-Bertani (LB) الذي تم أستعماله في بحوث عدة أذ تنمى العزلات المراد استخلاص المحتوى الوراثي منها مدة ليلة كاملة ويعود سبب استبدال الوسط LB بوسط مرق نقيع القلب والدماغ الى توفره بالمختبرات ويستعمل كوسط مغذً لجميع انواع البكتيريا دون شروط وكانت نتائج الاستخلاص جيدة بدون مشاكل، استعملت كذلك طريقة سريعة وهي قشط مستعمرات البكتيريا النامية بشكل جيد على وسط أكار الجكليت بواسطة الناقل بعد التعقيم جيدا ثم عُلقت في المحلول الاول المستخدم في استخلاص الحامض النووي DNA واستكملت بعدها خطوات الاستخلاص. تحتاج هذه الطريقة الحذرالشديد اثناء قشط المستعمرات كذلك تحتاج لظروف معقمة اثناء نقل المستعمرات لكي يساعد ذلك بالحصول على DNA نقي الا انها تختصر بعض الوقت اثناء عملية الاستخلاص.

استعملت خلايا البكتيريا المعلقة في المحلول الفسلجي والتي تم تجميدها سابقا والتي علقت عن طريق اخذ المسحات مباشرة من الشخص المصاب في 2 مليلتر من المحلول الملحي الفسلجي وحفظت في درجة حرارة -20م°. تركت فترة ساعة واحدة لتذوب ثم طردت مركزياً بسرعة عالية من اجل ترسيب الخلايا البكتيريا واستكملت بعدها خطوات الاستخلاص اذ تم عمل هذه الخطوات مثل ما اشار اليه [٣٢] Shahcheraghi *el al*. .

استعملت خلايا البكتيريا المعلقة في المحلول الملحي الفسلجي والتي تم تجميدها سابقا والتي علقت عن طريق اخذ أدرار الشخص المصاب و طردت مركزياً بسرعة 5000 دورة بالدقيقة لمدة 5 دقائق وعلق الراسب في 2 مليلتر من المحلول الملحي الفسلجي وحفظت في درجة حرارة -20 م°. وتركت فترة ساعة واحدة لتذوب وطردت مركزياً بسرعة عالية من اجل ترسيب خلايا البكتيريا واستكملت بعدها خطوات الاستخلاص. وكانت نتائج الاستخلاص جيدة وبدون مشاكل وبتركيز ونقاوة عاليتان اذ تراوح تركيز الحمض النووي DNA بين 0.05-0.15 مايكروغرام\ مايكرولترونقاوه تتراوح بين 1.4-1.8. يبين الشكل (3) حزم الحامض النووي DNA المستخلص من مجموعة عزلات بكتيريا السيلان وكذلك الحامض النووي DNA المعلق في المحلول الفسلجي وايظا الحامض النووي DNA من خلايا البكتيريا المعلقة في المحلول الفسلجي المأخوذ من عينات الادرار للمصابين.



الشكل (3) الترحيل الكهربائي للمحتوى الوراثي المستخلص بإستعمال هلام الاكاروز 1% (45 دقيقة ،7 فولت\اسم٢).

(مسار رقم 8,3,1 الحامض النووي DNA المستخلص من عينات المسحات المعلقة في المحلول الفسلجي، مسار رقم 9,7,6,4 الحامض النووي DNA المستخلص من عينات الادرار، مسار رقم 5,2 الحامض النووي DNA المستخلص من عزلات البكتيريا).

التشخيص بتقنية تفاعل السلسة المتعددة

من خلال استعمال عدة تفاعل السلسة المتعددة وحسب تعليمات الشركة المصنعة Bioneer أجري التفاعل بحجم 20 مايكروليتراً. أخذ 15 مايكروليتر كحجم ثابت من المزيج الرئيسي والذي يتكون من *Tag* polymerase, $dNTPs,MgCl_2$ وكما مدرجة في جدول (1) واكملت باقي المواد حسب الظروف المثلى بادئ (الجدول 2).

تم في التجارب تغيير الظروف لغرض الوصول الى الظروف المثلى للبادئ اذ تم التلاعب بدرجة حرارة الالتحام (Annealing Temperature) وكذلك الوقت المناسب لهذه المرحلة.

التشخيص الوراثي للجين *rmp* .

استعمل لتحديد الجين *rmp* البادئ المصمم في هذه الدراسة وتم تحديد الظروف المثلى للبادئ والتي ثُبتت بالجدول (٢) أذ تم اجراء تجارب عدة لغرض الوصول الى هذه الظروف حيث لوحظ ان افضل حجم DNA template هو 2 مايكرولتر، ان لحجم DNA الداخل في التفاعل يعد من المؤشرات المهمة لضمان ارتباط البادئ مع مكملاته.

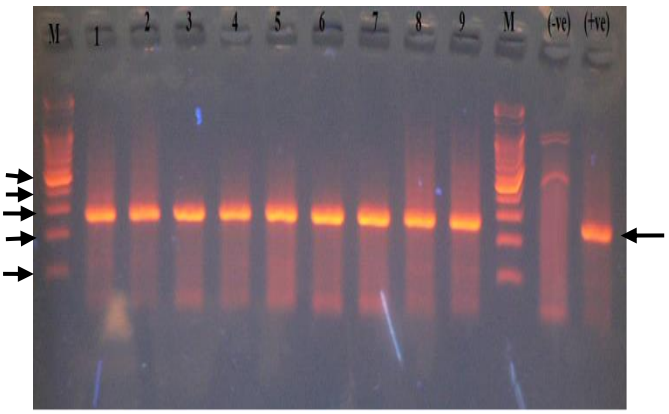
واستعمل 1 مايكرولتر للبادئ الامامي بتركيز 10 بيكومول/ مليلتر و1 مايكرولتر بتركيز 10 بيكومول/ مليلتر للبادئ العكسي و في خطوات تفاعل السلسلة المتعددة استعملت درجة الحرارة 94 مئوية كبداية لتفاعل المسخ الاولي (initial denaturation) ولمدة ثلاثة دقائق لدورة واحدة، وثبتت هذه الدرجة لكل العينات، وكمحاولة للوصول للدرجة المثلى لعمل انزيم البلمرة والخروج بافضل ناتج لذا اعتمد بذلك على تفاعل Gradient PCR لأختصارالوقت نسبة لكثرة العينات أذ ضبطت درجة الحرارة المثلى باستعمال اكثر من درجة بنفس الوقت لان العمل كل مرة بدرجة حرارة واحدة ومعينة يأخذ وقتاً طويلاً حيث تبلغ المدة الزمنية المجملة للتفاعل تقريبا ساعتين بالاضافة الى الوقت المستغل في عملية الترحيل الكهربائي للكشف عن حزم DNA لنواتج تفاعل السلسلة المتعددة وأستعملت درجات الحرارة 50 -70 مئوية لمدة 30 ثانية. حددت هذه الظروف بالاعتماد على افضل النتائج التي ظهرت، وعند ترحيل النواتج كهربائيا كان افضل وهج تحت الاشعة فوق البنفسجية هو لناتج التفاعل المتضمن درجات الحرارة 64 و66 مئوية، اما درجات الحرارة 50-62 مئوية كان الوهج ضئيل جدا وهذا يدل على ان هذه الدرجات غير مناسبة لالتحام البادئ المتخصص مع التوالي المستهدف على شريط DNA في حين كان الترحيل عند درجة الحرارة 70 مئوية غير واضح تماما. لذا اعتمدت الدرجة 66 مئوية والتي اعطت افضل النتائج في عدة تجارب و عند مقارنة حجم ناتج التفاعل مع DNA القياسي بالترحيل الكهربائي كان الحجم تقريبا 267 زوج قاعدة (الشكل 4) وهذه النتيجة مطابقة تماما مع النتائج النظرية لبرنامج Insilico PCR amplification.

بعد تثبيت الظروف المثلى للبادئ المستخدم للتشخيص في تفاعل PCR اجري الفحص الوراثي على 38 عزلة شخصت على انها *N.gonorrhoeae* بالاختبارات الكيميائية الحيوية والفحص المجهري واعتبرت سيطرة ايجابية (Control positive) في تفاعل PCR للتاكد من عمل الانزيم وعمل البادئ وارتباطه بتسلسل الجين rmp ودرجات الحرارة المستخدمة في خطوات تفاعل PCR.

ولأجل التأكد من ان البادئ لا يرتبط مع التسلسل غير تسلسل الجين rmp أجريت سيطرة سلبية

٢٦٧
pb

(Control negative) وذلك بأجراء تفاعل PCR لعينات بكتيرية اخرى منها *E.coli*.



الشكل (٤): ناتج تفاعل PCR للكشف عن الجين *rmp* بأستعمال هلام الاكاروز 2% (60 دقيقة ،7 فولت\سم^{2}).

(المسار M DNA قياسي، المسار 3,2,1 عينات البكتيريا، المسار 6,5,4 عينات المسحات المباشرة، المسار 9,8,7 عينات الادرار، المسار (-ve) بكتيريا *E.coli*، المسار (+ve) بكتيريا *N.gonorrhoeae*).

اجري الفحص الوراثي على 80 عينة ادرار باستخدام تفاعل PCR وبنفس الظروف المستخدمة في التفاعل السابق واظهرت النتائج ان هناك 75(93.75%) عينة موجبة و5 عينة اعطت نتيجة سلبية يعود سبب ذلك الى طرق جمع العينات حيث على المريض الانتظار لمدة ساعتين قبل اعطاء العينة ويجب تنبيه المريض على اعطاء اول 5 مليلتر من الادرار بعد مرور ساعتين على عدم التبول. والسبب الاخر قد يعود الى ما اشار اليه[6] Whiley *et al*. الى وجود بعض المواد في الادرار مثل البروتينات والنترات والهيموغلوبين والبلورات (crystals).

اجري الفحص الوراثي على 80 عينة مسحة مباشرة باستخدام تفاعل PCR وبنفس الظروف المستخدمة في التفاعل السابق واظهرت النتائج ان هناك 77(96.25%) عينة موجبة و3 عينة اعطت نتيجة سلبية وقد يعود سبب ذلك الى ان الاشخاص الذين اخذت منهم العينات غير مصابين اصلا ببكتيريا *N.gonorrhoeae* او يكونون مصابين والمسحة اخذت من مناطق لا تحتوي على بكتيريا.

اثبتت النتائج السابقة ان التشخيص بأستخدام تفاعل PCR اكثر حساسية مقارنة مع طريقة الزرع والفحص المجهري وذلك لأن في تفاعل PCR يمكن تشخيص بكتيريا السيلان للاشخاص المصابين الذين لديهم اعراض والاشخاص بدون اعراض على العكس من طريقة الزرع والفحص المجهري التي تتعامل مع الاشخاص الذين لديهم اعراض فقط وهذا ما اشار اليه Whiley *et al*. [6] ايضا وكذلك في تفاعل PCR لا تحتاج ان تكون البكتيريا حية وبذلك سوف تكون جمع العينات ونقلها وخزنها اسهل والعينات في تفاعل PCR ممكن ان تؤخذ من مناطق اصابة قليلة الغزو وكذلك اخذ العينات في تفاعل PCR يكون اسهل بالنسبة للاشخاص الذين لديهم شك بالاصابة حيث تكون اقل احراجا وبعيدا عن القيود الدينية والاجتماعية وامكانية اجراء التشخيص بعد اخذ العلاج ايضا.

ومن النتائج السابقة لكل من عينات الادراروالمسحات المباشرة اظهربأن حساسية المسحات المباشرة 96.25% اكثر من عينات الادرار 93.75% وهذا ما أشار له [٣٣] Laura Dize *et al.* بأن حساسية تفاعل PCR للمسحات المباشرة تصل الى 100% مقارنة مع عينات الادرارالتي تصل حساسيتها 88.9% ويتفق كذلك مع Para-Shnchez *et al*. [34] بأن حساسية المسحات المباشرة مقارنة مع عينات الادرار 100% و 99.4% على التوالي وقد أشار Sin Hang Lee *et al*. [35] الى معرفة تسلسل الحمض النووي هو أداة مفيدة في التحقق من صحة التشخيص الجزيئي.

References

[1] Elias, J.; Frosch, M.; and Vogel, U. "*Neisseria*, Manual of Clinical Microbiology". Versalovic, K. C.; Carroll, J. H.; Jorgensen, G. Funke; M. L. Landry and D. W. Warnock (eds.), 11ed. ASM Press, Wshinton, DC. p. 559-573. 2011.

[2] Hjelmevoll, S.O.; M.E. Olsen; J.U.E. Sollid; H. Haaheim; M. Unemo; and V. Skogen, "A fast real-time polymerase chain reaction method for sensitive and specific detection of the *Neisseria gonorrhoeae* porA Pseudogene". J. Mol. Diagn.,V. 8. p. 574-581. 2006.

[3] World Health Organization (WHO). "Prevalence and incidence of selected sexually transmitted infections: *Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, syphilis and Trichomonas vaginalis*". Methods used by WHO to generate 2005

estimates. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2011.

[4] Galvin, S.R., and Cohen, M.S. "The role of sexually transmitted diseases in HIV transmission". Nat. Rev. Microbiol. V.2. p. 33-42. 2004.

[5] Geraats-Peters, C. W. M.; M. Brouwers; P. M. Schneeberger; A. G. M. van der Zanden; S. M. Bruisten; G. Weers-Pothoff; C. H. E. Boel; A. J. C. van den Brule; H. G. Harmsen and M. H. A. Hermans. "Specific and Sensitive Detection of *Neisseria gonorrhoeae* in Clinical Specimens by Real-Time PCR". J. Clin. Microbiol. V. 43 (11). p. 5653-5659. 2005.

[6] Whiley, D.M.; J.W. Tapsall and T.P. Sloots. "Nucleic acid amplification testing for *Neisseria gonorrhoeae* an ongoing challenge". J. Mol. Diagn., V. 8.p. 3-15. 2006.

[7] Garnett, G. P.; K. J. Mertz; L. Finelli; W. C. Levine, and M. E. St Louis. "The transmission dynamics of gonorrhoea: modelling the reported" behaviour of infected patients from Newark, New Jersey. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.V. 354. p. 787-797. 1999.

[8] Seib, K. L.; H. J. Wu; S. P. Kidd; M. A. Apicella; M. P. Jennings, and A. G. McEwan. "Defenses against oxidative stress in *Neisseria gonorrhoeae*: a system tailored for a challenging environment". Microbiol. Mol. Biol. Rev. V. 70. p. 344-361. 2006.

[9] Tapsall, J. W. "*Neisseria gonorrhoeae* and emerging resistance to extended spectrum cephalosporins". Curr. Opin. Infect. Dis.V. 22.p. 87-91. 2009.

[10] Tapsall, J. W.; Ndowa, F.; Lewis, D. A. and Unemo, M. "Meeting the public health challenge of multidrug- and extensively drug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*". Exp. Rev. Anti. Infect. Ther. V. 7. p. 821– 834. 2009.

[١١] Unemo, M., D. Golparian, and A. Hestner. "Ceftriaxone treatment failure of pharyngeal gonorrhoeae verified by international recommendations". Eureosurveillance.V.16(6). P.10. 2011.

[١٢] Ohnishi, M., D. Golparian, K. Shimuta, T. Saika, S. Hoshina, K. Iwasaku, S. I. Nakayama, J. Kitawaki, and M. Unemo. "Is *Neisseria gonorrhoeae* initiating a future era of untreatable gonorrhea? Detailed characterization of the first high-level ceftriaxone resistant strain". Antimicrob. Agents Chemother. V. 55. p. 3538–3545. 2011.

[١٣] Janda, W. M. and C. A. Gaydos. "Gram-Negative Bacteria: *Neisseria*, Manual of Clinical Microbiology". *In*: P. A. Murray (ed.), ASM Press, Washington. p. 601-620. 2007.

[١٤] Edwards, J. L., and M. A. Apicella. "The molecular mechanisms used by *Neisseria gonorrhoeae* to initiate infection differ between men and women". Clin. Microbiol. Rev. V. 17. p. 965-981. 2004.

[١٥] Kinghorn, G. "Pharyngeal gonorrhoeae : a silent cause for concern". Sex. Transm. Infect. V. 86. p. 413- 414. 2010.

[١٦] Luijt, D.S., P.A.J. Bos, A.A.V. Zwet, P.C.V. Vader and J. Schirm. "Comparison of COBAS AMPLICOR *Neisseria gonorrhoeae* PCR, Including confirmation with *N. gonorrhoeae* -Specific 16S rRNA PCR, with traditional culture". J. Clin. Microbiol. V. 43. p. 1445-1447. 2005.

[17] Catherine, A., Ison,; Daniel, Golparian,; Pamela, Saunders, Stephanie, Chisholm, and Magnus, Unemo. "Evolution of *Neisseria gonorrhoeae* is a continuing challenge for molecular detection of gonorrhoeae: false negative gonococcal *porA* mutants are spreading internationally". *Sex. Transm. Infect*. Published Online First: 13 December 2012.

[18] Bignell, C. "European 2009 (IUSTI/WHO) guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults". Int. J. STD. AIDS. V. 20. P. 453-457. 2009.

[19] Janda, W.J. and Knapp, J.S. "*Neisseria* and *Moraxella catarrhalis*" Manual of Clinical Microbiology, 8th edn In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Yolken RH, eds. Washington: American Society Microbiology: p. 585-608. 2003.

[20] Lai-King, Ng. and Irene, E. Martin. "BSc The laboratory diagnosis of Neisseria gonorrhoeae Can". J. Infect. Dis. Med. Microbiol. V. 1. p.16 . 2005.

[21] Santos, C.; Texeira, F.; Vicente, A. and Astoifi-Filho, S. "Detection of C. trachomatis in endocervical smears of sexually active women in Manaus-AM,

Prevention (CDC). Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010". MMWR Recomm Rep. V.59(12). p.1-110. 2010.

[30] Todar, K. "The Pathogenic *Neisseriae*". In: Todar.s online Textbook of Bacteriology. Department of Bacteriology, The University of Winconsin-Medison. Webpage, retrieved fromThe pathogenic *Neisseriae*.htm. (accessed on: 20/04/2008). 2005.

[31] Turton, J.F.; Hatice, B.; Siu, L.K.; Mary, E. K. and Tyrone, L. P. "Evaluation ofa multiplex PCR for detection of serotypes K1, K2 and K5 in Klebsiella sp. and comparison of isolates within these serotypes". Fems Microbiol. Lett. V. 284. P. 247–252. 2008.

[٣٢] Shahcherghai, F.; Nikbin, V.S. and Feizabadi, M.M. "Identification and genetic characterization of metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas aeruginosa* in Tehran, Iran". New Microbiol. V.33. p. 243-248. 2010.

[٣٣] Laura, Dize; Patricia, Agreda; Nicole, Quinn; Mathilda, R. Barnes; Yu-Hsiang, Hsieh and Charlotte, A. Gaydos. "Comparison of self-obtained penile-meatal swabs to urine for the detection of *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* and *T. vaginalis*". Sex. Transm. Infect. V. 10. p.113. 2012.

[34] Parra-Sánchez, Manuel; Jose, Carlos, Palomares; Samuel, Bernal; María, Trinidad, González; Nieves, Sivianes; Luis, Pérez; Isabel, Pueyo; Estrella, Martín-Mazuelos; "Evaluation of the cobas 4800 CT/NG Test for detecting *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* DNA in urogenital swabs and urine specimens". Diagnostic Microbiol. and Infect. Dise. V. 74(4). p. 338–342. 2012.

[35] Sin Hang Lee, M.D.; Veronica, S. Vigliotti; CMIAC, and Suri, Pappu, M.D. "DNA Sequencing Validation of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* Nucleic Acid Tests". Am. J. Clin. Pathol. V.129. p. 852-859. 2008.

Abstract

Brazil, by PCR". Braz. J. Infect. Dis., Brazil. V. 7 .p. 91-95. 2003.

[22] Mohammad, A. Farraj; Gabi, M. Abusada; Abed Alraoof, M. Saleem; Ayyub, Y. Joaidi; Raba, M. Radad; Hiba, N. Atrash; Israr, N. Sabri and Tamer, A. Essawi, "Detection of Neisseria gonorrhoeae in Palestinian women using polymerase chain reaction". Asian Biomedicine. V. 4 (4). P. 637-640. 2010.

[23] Janda, W. M. and C. A. Gaydos. "Gram-Negative Bacteria: *Neisseria*, Manual of Clinical Microbiology". *In*: P. A. Murray (ed.), ASM Press, Washington. p. 601-620. 2007.

[24] Chessbrough, M. "Microbiological tests, Gram technique". In: *District laboratory practice in tropical countries*, part 2. UK: Cambridge University Press. p. 38-39. 2000.

[25] Haddow, L.J.; Bunn, A.; Copas, A.J.; Gilson, R.; Prince, M.; Ridgway, G.L. and Sadiq, S.T. "Polymorph count for predicting non-gonococcal urethral infection: a model using *Chlamydia trachomatis* diagnosed by ligase chain reaction". Sexually Transmitted Infections. V. 80. p. 198-200. 2004.

[26] Iser, P., Read, T.R.H., Tabrizi, S., Bradshaw, C., Lee, D., Garland, S., Denham, I. and Fairley, C.K." Symptoms of non-gonococcal urethritis in heterosexual men: a case ontrol study". Sex. Trans.Infect., V.81. p. 163-165. 2005.

[27] Vesic, S., Vukicevic, J., Dakovic, Z., Tomovic, M., Dobrosavlijevic, D., Medenica, L. and Pavlovic, M.D. "Male urethritis with and without discharge: relation to microbiological findings and polymorphonuclear counts." Acta Dermatovenereologica Alpina Pannonica et Adriatica. V. 16 (2). P. 53-57. 2007.

[28] Elizabeth, A. Stohl1; Yolande, A. Chan; Kathleen, T. Hackett; Petra, L. Kohler; Joseph, P. Dillard; and H. Steven, Seifert. "The *Neisseria gonorrhoeae* virulence factor NG1686 is a bifunctional M23B family metallopeptidase that influences resistance to hydrogen peroxide and colony morphology". J. Bio. Chem. V.287 (14). p.11222-11233.2012.

[29] Workowski, K.A. and Berman, S. "Centers for Disease Control and

This study included 80 clinical samples from patients suspected to have gonorrhoea (a urine sample and two direct smears from each patient) from different areas of Baghdad, Kut and Suwairah regions, from private clinics and laboratories during November 2011 till June 2012. Cases caused by gonococci were diagnosed by finding the *Neisseria gonorrhoea*e bacteria in the samples using microscopic examination and culturing on cultures for all the 80 samples which included 17 (21.25%) women and 63 (78.75%) men. Microscopy and culture revealed that 47 out of the 80 (58.75%) samples were positive: 35(43.75%) of them diagnosed by both microscopy and culture on chocolate agar, Neisseria media and modified Thayer-Martin media; while 9 (11.25%) samples were diagnosed by microscopy alone (cultures were negative) and the remaining 3(3.75%) samples by culture alone (microscopy was negative). Results of the genetic diagnosis looking for the bacteria causing gonorrhoea using primers specific for the *rmp* gene which were specially designed for this study revealed that 77 (96.25%) of the direct smears and 75 (93.75%) of the urine samples were positive.

Keywords: *Neisseria gonorrhoeae*, *rmp* gene, *gonorrhoe*.