جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الموصل / كلية العلوم
قسم علوم الحياة

عزل وتشخيص *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* من مرضى التهاب دواعم السن ودراسة الفعالية الحيوية للسموم المنتجة منها

إيمان محمود خضر أحمد الخياط

أطروحة دكتوراه
علوم الحياة / أحياء مجهرية

بإشراف
أ. د. أديبة يونس شريف حمو النعمان

1444هـ
2022 م

الخلاصة

أولت الدراسة الحالية اهتماما بعزل وتشخيص بكتريا *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* بوصفها أحد المسببات الرئيسة الممرضة لالتهاب دواعم السن من المرضى المراجعين لوحدة أمراض اللثة في كلية طب الأسنان في جامعة الموصل ومركز النور التخصصي لطب الأسنان والمركز التخصصي في الجانب الأيمن للفترة من كانون الثاني 2021 لغاية شهر آب 2021 ، إذ جمعت 96 عينة من عمق الجيب المتكون في اللثة وبعمق اكثر من 4 ملم . أعطت جميع العينات نموا بكتيريا وبنسبة 100% ، وتم تشخيص البكتريا مظهريا بالاعتماد على شكل النمو وعلى شكل المستعمرات التي تظهر بمركز يشبه النجمة تحت المجهر الضوئي عند العزل الأولي وزرعيا بنموها على الأوساط الانتخابية الخاصة بها Dentaid-1 و *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Growth Medium (AAGM) و Tryptic Soy Serum Bacitracin Vancomycin (TSBV) فضلا عن استخدام الوسط Cystine Heart agar لأول مرة في تنقيتها والذي أظهر كفاءة في تعزيز نموها ، كما تم التحري عن بعض الخصائص الكيموحيوية باستخدام عدة اختبارات ، إذ أبدت البكتريا نتيجة موجبة لكل من اختبار انتاج انزيم الكاتليز ، اختزال النترات ، انتاج الانزيم المحلل للحامض النووي منقوص الأوكسجين DNase ونتيجة سالبة لكل من اختبار انتاج الاندول ، النمو على اكار الماكونكي ، تحلل أملاح الصفراء، انتاج الانزيم المحلل لليوريا والانزيم الحال الدم ، وأعطت نتيجة متغايرة تجاه انتاج انزيم الأوكسديز وأجريت محاولة لتحديد طور النمو اللوغارتمي ومنحني النمو لهذه البكتريا التي تمتاز بكونها بطيئة النمو، إذ استمر طور النمو اللوغارتمي لفترة 30 ساعة دخلت بعدها البكتريا في طور السكون الذي استمر إلى 72 ساعة.

أستخدمت مادة بيكاربونات الصوديوم والخل الابيض لأول مرة إلى جانب الشمعة المشتعلة لتوفير زيادة من غاز ثنائي أوكسيد الكاربون الضروري لتعزيز نمو البكتريا التي تتطلب وجود 5–10% من الغاز لنموها ، وأبدت هذه الطريقة نتائج جيدة في تعزيز نمو البكتريا وتعد هذه الطريقة غير مكلفة اقتصاديا وبديلا عن استخدام مغلفات الـGas pack المكلفة و التي لم تتوفر خلال فترة الدراسة.

انتخبت 35 عزلة من البكتريا لتاكيد تشخيصها جزيئيا باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل اللحظي quantitative PCR وبالتحري عن ثلاث جينات لهذا النوع وهي جين النمط المصلي b وجين بروتين *cag*E وجين ذيفان خلايا الدم البيض *ltx*A Leukotoxin وأظهرت النتائج أن 60% من البكتريا تعود للنمط المصلي b و63.5% تمتلك جين *cag*E وأن جميع العزلات امتلكت جين ذيفان خلايا الدم البيض بنسبة 100%.

تمت دراسة تأثير مادة لاكتات الصوديوم على نمو بكتريا *A. actinomycetemcomitans* وعلى انتاجها للذيفان ، إذ تمت تنمية البكتريا على الوسط الانتخابي Dentaid-1 المضاف اليه التراكيز 0.015% ,0.025%, 0.05% و 0.075% من مادة لاكتات الصوديوم كلاً على حدا ولوحظ أن التركيز 0.075% كان الأكفأ في تعزيز نموها واختيرت ثلاث عزلات للتحري عن تأثير لاكتات الصوديوم على مستوى انتاج ذيفان خلايا الدم البيض إذ زرعت ثلاث عزلات على الوسط الانتخابي Dentaid-1 المضاف إليه تركيز 0.075% من لاكتات الصوديوم وعلى الوسط الخالي من اللاكتات وتبين أن عدد نسخ جين ذيفان خلايا الدم البيض تزداد بوجود مادة لاكتات الصوديوم مقارنة مع العزلات النامية على وسط Dentaid-1 الخالي من لاكتات الصوديوم.

تم في هذه الدراسة عزل و تنقية بروتين ذيفان خلايا الدم البيض جزئيا باستخدام تقنية كروماتوغرافيا العمود Column Chromatography من عزلة مرضية شخصت بامتلاكها الجينات الثلاثة ، كما تم عزل الجزء البروتيني الذي أظهر أعلى امتصاصية عند الطول الموجي 280 نانوميتر .

تم التحري عن الفعالية الحيوية لذيفان خلايا الدم البيض وللجزء البروتيني الذي أظهر أعلى امتصاصية ولراشح مزرعة البكتريا الخام ضد خلايا خط HL-60 لابيضاض الدم البشري وخلايا خط HDFn الطبيعية مقارنة مع العقار الكيميائي Azacitidine وتبين ان الذيفان يظهر فعالية واضحة في تثبيط خلايا ابيضاض الدم وبكفاءة أعلى من فعالية العقار Azacitidine إذ بلغت قيمة IC50 للذيفان على خلايا خط HL-60 23.22 وللعقار 45.58 وكان تأثير الذيفان على الخلايا الطبيعية منخفضا إذ بلغت قيمة IC50 122.1 مقارنة بالعقار الذي أبدى سمية على الخلايا الطبيعية وبقيمة IC50 بلغت 62.69 .

كما اظهر كل من الجزء البروتيني المفصول الذي أعطى أعلى امتصاصية والراشح الخام لمزرعة البكتريا فعالية في طريقة معتمدة على الجرعة ضد خلايا خط ابيضاض الدم وبكفاءة مقاربة للعقار الكيميائي وبسمية أقل على الخلايا الطبيعية إذ بلغت قيمة IC50 للجزء البروتيني والراشح الخام على خلايا خط HL-60 42.2 و47.6 على الترتيب بينما بلغت قيمة IC50 للعقار الكيميائي على خلايا خط HL-60 45.58.

و بلغت قيمة IC50 للجزء البروتيني والراشح الخام على خلايا خط HDFn الطبيعية 73.5 و105.0على الترتيب بينما بلغت قيمة IC50 للعقار الكيميائي على خلايا خط HDFn الطبيعية 62.69.

Abstract

The current study paid attention to the isolation and identification of *A. actinomycetemcomitans* as one of the main pathogens of periodontitis from the patients who attendending periodontitis unit of the Faculty of Dental Medicine of the University of Mosul , Alnoor specialized center for dentistry and specialized center on the right side,There are 96 samples were collected from the depth of the pocket formed in the gum (more than 4 mm depth). All samples showed positive results of growth (100%), the bacteria were diagnosed phenomenally based on the colony morphology that appear as a star-like center under the light microscope at the initial isolation and their growth characteristics on selective media including: Dentaid-1, AAGM and TSBV as well as the use of the medium Cystine heart agar for the first time in the purification of the bacteria which this medium improved its efficiency in growth promoting. Some of the biochemical tests were also investigated using several chemical tests including the catalase which showed a positive result, nitrate reduction and the production of DNase which also gave positive results ,indole production test showed negative result, growth on MacConkey, esculin and bile hydrolysis, hemolysin and urease enzyme production were also negative, while the production of oxidase was variable.

An attempt was made to determine the stage of logarithmic growth and growth curve of this slow-growing bacteria. The study showed that logarithmic growth continued from 2 hours till 30 hours after which the bacteria enters the stationary phase which continues till 72 hours.

Sodium bicarbonate and white vinegar were used for the first time alongside the flaming candle to provide an increase in carbon dioxide gas necessary to promote the growth of this bacteria that require 5-10% gas to

grow. This method showed good results in promoting the growth of bacteria. This method is economically inexpensive compared to the use of costly gas pack envelopes which was unavailable during the study period

The diagnosis of 35 isolates were confirmed using qPCR technology investigating the presence of three genes of this species , namely the serotype b gene, the cagE protein gene and the Leukotoxin (LtxA) gene. The results showed that 60% of bacteria belong to the serotype b and 63.5% possess the *cag*E gene and all samples possess *ltx*A gene.

The effect of sodium lactate on the growth of *A. actinomycetemcomitans* and on their production of leukotoxin was studied by inoculating the bacteria on the selective medium Dentaid-1 containing different concentrations including (0.015%, 0.025%, 0.05% and 0.075%) separately. The concentration 0.075% was the most efficient in promoting the growth . Three isolates were selected to investigate the effect of sodium lactate on their growth and on the level of leukotoxin gene production. These isolates were cultured on Dentaid-1 containing 0.075% concentration of sodium lactate and on the same medium without the salt. The result showed an increase in the number of gene copies of the gene *ltx*A in isolates grown on Dentaid-1 containing 0.075%sodium lactate.

The protein leukotoxin was isolated and partially purified in this study using column chromatography from an isolate of *A. actinomycetemcomitans* diagnosed as having the three genes and the protein fraction that showed the highest absorbance at 280 nm was isolated.

The biological effect of purified Leukotoxin, the protein part that showed the highest absorbance and the crude extract of the bacteria were investigated against human leukemia cell lines HL-60 and natural HDFn

cell lines in comparison with the effect of the chemical drug Azacitidine ,the results showed that Leukotoxin show a clear effectiveness in inhibiting leukemia cells with IC50= 23.22 and with higher efficiency than Azacitidine which has IC50=45.58 and the leukotoxin has low effect on the normal cell (IC50=122.1)compared with Azacitidine (IC50=62.69).

Each of the separated proteins that gave highest absorption and crude bacterial culture extract also showed effectiveness depending on the dose against leukemia cell lines HL-60 and similar efficiency to the chemical drug and less toxicity on natural cells HDFn, IC50 for separated proteins and crude extract on HL-60 cell lines were (42.2 and 47.6) respectively while the IC50 of Azacitidine was (45.58),and the IC50 of separated proteins and crude extract on HDFn cell lines were (73.5 and 105.0) respectively and IC50 for Azacitidine was (62.69) on HDFn cell lines.

University of Mosul
College of Sciences
Department of Biology

Isolation and Identification of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* From Periodontitis Patients and Study the Biological Activity of its Toxin

Iman Mahmood Khudhur Ahmed Al-Khayyat

Ph.D.Thesis
Biology /Microbiology

Supervised by
Prof.
Dr. Adeeba Younis Shareef H. Al-Numan

1444 A.H. **2022 A.D.**