وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الموصل
كلية التربية للبنات
قسـم علوم الحياة

عزل وتشخيص الجراثيم السالبة لصبغة گرام المسببة لإصابات الجروح والحروق والكشف عن تأثير مادة N-acetyl cysteine على تكوين الغشاء الحيوي باستخدام تقنية qPCR

إيمان عبد الرزاق حمد نايف الجريسي

رسالة ماجستير
في علوم الحياة

بإشراف
أ. د ريم زهير شاكر

1447هـ 2026م

الخلاصة

تم في هذه الدراسة جمع 103 عينة 54 عينة منها أظهرت نمواً على اكار الماكونكي من المرضى المراجعين والراقدين في مستشفى السلام التعليمي ومستشفى الموصل العام ومركز الموصل للحروق والجراحة التجميلية المصابين بِالتهابات الجروح والحروق وبِأعمار تراوحت من (5 ايام –75 عاماً) ولِكلا الجنسين للمدة 28\8\2024 لِغاية 23\11\2024، أُجريت على العُزلات الجرثومية الفحوصات التشخيصية والاختبارات الكيموحيوية وتّم دعم نتائج التشخيص بِاستخدام نظام فايتك .2 للتأكد من تحديد الأنواع. واستناداً إلى جميع الفحوصات التشخيصية تَّم الحصول على (87) عُزلة جرثومية مثلت الزوائف الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* و *Enterobacter cloacae* نسبة العزل الأكثر بِنسبة (31.81%) تلاه *Klebsiella pneumoniae* بِنسبة (11.39%) جراثيم *Klebsiella aerogenes* بنسبة (7%) جراثيم *Escherichia coli* بِنسبة (8%) كما بلغت *Raoultella ornithinolytica*و *Proteus vulgaris* و *proteus mirabilis* نسبة (2.20%) كما بلغت *Acinetobacter baumannii* و *Serratia marcescens* النسبة الأقل من العزل بنسبة (1.13%).

تَّم إجراء فحص الحساسية للمضادات الحيوية لِجميع العُزلات الجرثومية قيد الدراسة البالغ عددها (88) عُزلة جرثومية ، أظهرت النتائج امتلاك الجراثيم السالبة لِغرام مقاومة عالية لمضادات السيفالوسبورينات (Ceftazidim) بنسبة 95.5% و(Ceftraxone وCefotoxime) بنسبة 93% ومضادات المايكروليدات المتمثلة بالـ Azythromycin بنسبة 75%. كذلك أظهرت النتائج إن مضاد Chlormphenicol كان من أكثر المضادات فعالية ضد الجراثيم السالبة لصبغة گرام.

تَّم اختيار العُزلات الجراثيم الأكثر مقاومة للمضادات الحيوية وهي *Pseudomonas aeruginosa* و *Enterobacter cloacae* و *Klebsiella spp.* لمعرفة قدرتِها على إنتاج الغشاء الحيوي biofilm بطريقة الصفيحة المعيارية وأظهرت النتائج أن 3(23.07%)غير مكونة للغشاء و7(53.8%)ضعيفة التكوين للغشاء و3(23.07%)معتدلة التكوين للغشاء بالنسبة لعزلات *Pseudomonan aeruginosa* و1(16.66%)ضعيفة التكوين للغشاء و4(66.66%)معتدلة التكوين للغشاء و1(16.66%)قوية التكوين للغشاء بالنسبة لِعزلات

Klebsiella spp. و 7(70%)غيـر مكونـة للغشـاء و 2(20%) ضـعيفة التكـوين للغشـاء و 1(10%)معتدلة التكوين للغشاء بالنسبة لِعزلات *Enterobacter cloacae*.

تَّم دراسـة تـأثير مـادة N-Acetyl cysteine (NAC) علـى تكـوين الغشـاء الحيـوي بطريقـة الصـفيحة المعياريـة باسـتخدام التراكيـز 20mg/ml ,40mg/ml ,60mg/ml 80mg/ml, أظهرت تثبيط إنتاج الغشاء الحيوي وبنسب متفاوتة، أُستخدمت بعدها طريقة تخفيف المرق لِمعرفة التركيز الادنى القاتل MBC والتركيز الأدنى المثبط MIC والتركيز تحت الأدنى المثبط Sub MIC مِن مادة NAC ضد العُزلة PA11 اذ كان التركيز 3.125هو التركيز تحت الأدنى المثبط والذي استخدم لاحقا في تجربة q PCR.

تَّم استخدم التشخيص الجزيئي اعتماداً على جين *16S r RNA*لتأكيد التشخيص للعزلة PA11 كما أُجري تحليل تتابعي للموروث *16S r RNA* للعزلة ورسم الشجرة الوراثية التطورية فضـلاً عن تسـجيل العزلـة فـي بنـك الجينـات NCBI واعطيت الرقم التسلسـلي PX146768.1 والتي أُستخدمت فيما بعد لِدراسة التعبير الجيني عن الجينات المسؤولة عن إنتاج الغشاء الحيوي (*cupB, pela, rhlR, fimT*, *lecA, algD, lasR*) بِاستخدام تقنية Real- Time qPCR بعد معاملـة العزلـة بِمـادة NAC وتبـين ان مسـتوى التعبيـر الجينـي ارتفـع بالنسـبة لجين *pelA, rhlR*, وانخفضت نسبته في *الجينات LasR*, *algD*, *FimT LecA*, *cupB* وذلك بالمقارنـة مـع معاملة السيطرة والجين الأساسي *fabD*.

University of Mosul

College of Education for Girl

Isolation and identification of Gram-negative bacteria causing wound and burn infections and detection of the effect of N-Acetylcysteine on biofilm formation using qPCR technology

Iman Abdul Razzaq Hamad Nayef Aljuraisy

Master Thesis of Science

In

Biology

Supervised by

Professor

Dr. Reem Zuhair Shaker

2026 A.D **1448 A.H**

Abstract

In this study, 103 samples were collected, 54 of which showed growth on MacConkey agar, from patients admitted to Al-Salam Teaching Hospital, Mosul General Hospital, and the Mosul Center for Burns and Plastic Surgery, suffering from wound and burn infections, with ages ranging from 5 days to 75 years, and both sexes, during the period from August 28, 2024, to November 23, 2024. Diagnostic and biochemical tests were performed on the bacterial isolates, and the diagnostic results were supported using the VITEK-2 system to confirm the species identification.

Based on all diagnostic tests, (87) bacterial isolates were obtained. *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter cloacae* were the most numerous isolates at (31.81%), followed by *Klebsiella pneumonia* at (11.39%), *Klebsiella aerogenes* at (7%), and *Escherichia coli* at (8%). *Raoultella ornithinolytica, Proteus vulgaris*, and *Proteus mirabilis* each constituted (2.20%), while *Acinetobacter baumannii, Serratia marcescens*. constituted the smallest number of isolates at 1 (1.13%).

Antibiotic susceptibility testing was performed on all 88 bacterial isolates under study. The results showed that the Gram-negative bacteria exhibited high resistance to cephalosporin's (Ceftazidim, 95.5%), ceftriaxone and ceftoxime (93%), and macrolide antibiotics (Azithromycin, 75%). The results also indicated that chloramphenicol was among the most effective antibiotics against Gram-negative bacteria.

The most antibiotic-resistant bacterial isolates, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, and *Klebsiella spp*., were selected to determine their biofilm production using the standard plate method. The results showed that 3 (23.07%) of the *Pseudomonas aeruginosa* isolates were non-biofilm-forming, 7 (53.8%) exhibited weak biofilm formation, and 3 (23.07%) exhibited moderate biofilm formation.

1 (16.66%) weakly membrane-forming, 4 (66.66%) moderately membrane-forming, and 1 (16.66%) strongly membrane-forming for *Klebsiella spp*. isolates. 7 (70%) non-membranous, 2 (20%) weakly membrane-forming, and 1 (10%) moderately membrane-forming for *Enterobacter cloacae* isolates.
The effect of N-Acetyl cysteine (NAC) on biofilm formation was studied using the standard plate method with concentrations of 20 mg/ml, 40 mg/ml, 60 mg/ml, and 80 mg/ml. These concentrations showed varying degrees of inhibition of biofilm production. Subsequently, broth dilution was used to determine the minimum lethal concentration (MBC), minimum inhibitory concentration (MIC), and sub-MIC of NAC against isolate PA11. A concentration of 3.125 mg/ml was found to be the sub-MIC, which was subsequently used in the qPCR assay.

Molecular diagnosis based on the *16S rRNA* gene was used to confirm the diagnosis of the PA11 isolate. Sequencing analysis of the *16S rRNA* gene was performed for the isolate, and a phylogenetic tree was drawn. The isolate was also registered in the NCBI Gen Bank and given the serial number PX146768.1, which was subsequently used to study the gene expression of the genes responsible for biofilm production (*cupB, pela, rhlR, fimT, lecA, algD, lasR*) using Real-Time qPCR technology after treating the isolate with NAC. It was found that the level of gene expression increased for the *pelA* and *rhlR* genes, and decreased for the *cupB, FimT, LecA, algD*, and *LasR* genes, compared to the control treatment and the base gene *fabD.*