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

التحري المظهري والجزيئي عن العصيات النزلية المحبة للدم من اصابات الجهاز التنفسي في مدينة الموصل

زينة هشام جاسم حمو الدباغ

رسالة ماجستير

علوم الحياة/أحياء مجهرية

بإشراف

الأستاذ المساعد الدكتور شاكر غازي جرجيس المولى

١٤٤٤هـ 2023م

الخلاصة

شملت الدراسة جمع 120عينة من عينات الجهاز التنفسي العلوي والسفلي من المرضى الراقدين والوافدين من كلا الجنسين للفترة من شهر تموز 2022 ولغاية شهر تشرين الثاني 2022 من مستشفيات عديدة في محافظة نينوى .

شخصت العزلات جميعاً أعتمادا على صفاتها المظهرية والاختبارات الكيموحيوية والتشخيص باستخدام اختبار التبعية وباستخدام نظام API-NH وتأكيد التشخيص باستخدام تقنية الفايتك وتم الحصول على 12عزلة تعود لبكتريا *Haemophilus influenzae* بنسبة 10%و تم عزل انواع جرثومية أخرى سالبة لصبغة كرام التي شملت مايأتي *Pseudomonas aeroginosa, Escherichia coli, Klebsiella pneumonia, Serratia marcescence, Neisseria meningitids,* بنسب بلغت 0.83%,4.16%,10%, 10.8%,12.5%على التوالى اما الانواع الموجبة لصبغة كرام شملت *Staphylococcus aureus* و *Streptococcus pnumoniae* و*Streptococcus pyogenes, Nocardia* و بنسب بلغت 1.6%,4.1%,10%,20%على التوالي .

وتناولت الدراسة أيضاً طريقة اختبار جديدة ومحورة لظاهرة التبعية باستخدام بكتريا *Streptococcus pyogenes* ولأول مرة على المستوى المحلي , كانت هذه الطريقة اكثر دقة في تشخيص بكتريا *H. influenzae* لانها اعطت نتيجة واحدة سلبية كاذبة بينما اختبار التبعية مع العنقوديات الذهبية اعطى اربع نتائج سالبة كاذبة ,وركزت الدراسة على أستخدام وسط ناقل جديد باستخدام بكتريا العنقوديات الذهبية مع وسط نقيع القلب والدماغ والدم وهو وسط محور إذ لاتوجد دراسات بهذا الخصوص تميز بكفاءته مقارنة بالأوساط الاخرى إذ أسهم في الحفاظ على البكتريا مدة سبعة أيام .

تمت دراسة فعالية بعض الاوساط المستخدمة في حفظ العزلات وإدامتها منها (وسط نقيع القلب والدماغ مع الكليسيرول –وسط نقيع القلب والدماغ والدم المطبوخ مع الكليسيرول –وسط أكار الدم المطبوخ في موائل – وسط أكار الدم مع ظاهرة التبعية – وسط STGG (Skim milk trypton glucose&glycerin)– الوسط المحور في دراستنا وسط نقيع القلب والدماغ والدم مع بكتريا *Staph.aureus*)، إذ اعطى الوسط المحور أعلى نسبة لبقاء بكتريا *H. influenzae* نامية لمدة سبعة أيام .

وتم اختبار حساسية 12 عزلة من بكتريا *H. influenzae* تجاه عدد معين من المضادات الحيوية وأظهرت النتائج أعلى مقاومة للمضاد الحيوي Ampicillin و Erythromycin و Bacitracin بنسبة 100% يليها المضاد الحيوي Chloramphincol بنسبة 83.3%و Cefotaxim بنسبة 75% و Azithromycin بنسبة 66.6% .

وأجري تاكيد التشخيص باستخدام الطرائق الجزيئية بمقارنة تتابعات القواعد النتيروجينة باستخدام الجين 16S rRNA في المركز الوطني لمعلومات التقانات الحياتية NCBI باستخدام برنامج BLAST .

وأجري الكشف عن الجينات التشخيصية المشفرة لبروتينات الجدار *Omp6* وجين الانماط المصلية (a-d) وهو *Hin-in* والجين المشفر لمتعدد السكريات المحفظي *BexA* كما سجلت السلالتين ZESHA1 و ZESHA2 في بنك الجينات العالمي GenBank بالأرقام التسلسلية OQ067241 و OQ067240 على التوالي .و تم انشاءشجرة تطورية بين السلالات المحلية ZESHA1 و ZESHA2 وسلالات اخرى من بكتريا *H. influenzae* والشجرة الثانية كانت بين السلالات المحلية ZESHA1 و ZESHA2 وبين الانواع الاخرى لبكتريا *H. influenzae* وأظهرت النتائج أن السلالتين ZESHA1 و ZESHA2 لها علاقة تطورية متقاربة بنسبة 99% و96% على التوالي خاصة مع السلالة المصرية *Haemopilus egyptius*

تم التحري عن قدرة بكتريا *H. influenzae* على تكوين الاغشية الحيوية ، وأظهرت النتائج أن لعزلات بكتريا *H. influenzae* قيد الدراسة القدرة على أنتاج الاغشية الحيوية بنسبة 100% وبنسب متباينة بين العزلات فبعضها كانت شديدة التكوين للغشاء والبعض متوسطة التكوين للغشاء والبعض الاخر ضعيفة التكوين للغشاء .

تضمن المحور الاخير التحري عن قابلية مستخلصات الحمضيات (الليمون، نوم البصرة، البرتقال الياباني) على تثبيط بكتريا *H. influenzae* إذ أظهرت النتائج أن عصير الليمون الطازج هو الاكثر فعالية بقطر تثبيط 27 ملم يليه المستخلص الكحولي للبرتقال الياباني ثم المستخلص الكحولي لنوم البصرة وهو الاقل فعالية وتمت دراسة تأثير هذه المستخلصات على تثبيط تكوين الغشاء الحيوي لبكتريا *H. influenzae* وبينت النتائج أن عصير الليمون الطازج أعطى أعلى فعالية لتثبيط تكوين الغشاء الحيوي يليه المستخلص الكحولي لنوم البصرة ثم المستخلص الكحولي للبرتقال الياباني الذي أعطى اقل فعالية لتثبيط الغشاء الحيوي لبكتريا *H. influenzae* .

Abstract

The study included collection of 120 specimens from the upper respiratory tract and lower respiratory tract from incoming and outgoing patients in the hospitals of mosul city.

All isolates were diagnosed dependent on their phenotypic and biochemical tests and by using Satellitism Test and API-NH system, Twelve isolates at the rate 10%belonging to *H. influenzae* were obtained and their diagnosis was confirmed by using Vitek 2 compact system and molecular method, other bacteria were isolated and identified from respiratory tract samples were Gram negative bacteria such as, *P.aeruginosa , E. coli, k.pneumoniae, S. marcescens ,N. meningitids, ,* at the rates of, 12.5%,10.8% 10%,4.16% ,0.83%, respectively and Gram positive bacteria included, *Staph.aureus ,S. pneumonia S.pyogens, Nocardia nes* ,at the rates20.8% , 10%,4.1%, 1.66%, respectively.

The study also included new Satellitism test by using *S.pyogenes* instead of *Staph.aureus* for the first time this method was more accurate to identify *H. influenzae* because it was gave one false-negative result whereas satellitism by using Staph.aureus was gave four false-negative results.

The study focused on the use of new transport media by using (BHI) broth with *Staph.aureus* ,this media used for transport and preserve and activate *H. influenzae* isolates *H. influenzae* stay alive for seven days

The study investigated about some media for preserved *H. influenzae* isolates which was (BHI broth with glycerol - Chocolate BHI broth with glycerol - Chocolate agar slant - Satellitism plates - STGG medium - modified media in our study BHI broth with *Staph.aureus* the results showed that the modified medium gave highest period for kept *H. influenzae* isolates alive for seven days.

Antibiotics susceptibility test was performed by using eight antibiotics and the results showed that most of *H. influenzae* isolates were resistance to antibiotics at the rates 100% for Erythromycin, Bacitracin and Ampicillin

whereas Chloramphenicol and Cefotaxime and Azithromicin at the rates 83.3%, 75%,66.6% respectively.

Molecular diagnosis was carried out using 16SrRNA gene based on the sequencing method on NCBI National Center for Biotechnology Information website by using BLAST program. The study also included molecular identification for the gene encoded the outer membrane protein *Omp6* and the gene encoded for serotypes (a- d) and the gene encoded for the *Hin-in* Polysaccharide Capsule BexA gene .The strains ZESHA1 and ZESHA2 were submitted to GenBank under the accession number OQ067241 ,OQ067240 respectively.Two phylogenetic trees has been created between the strains ZESHA1 and ZESHA2 and the related strain of *H. influenzae* and the second tree showed the relationship between the strains ZESHA1 and ZESHA2 and the related species of Haemophilus spp. the results showed that the strains ZESHA1 and ZESHA2 have more relationship with these strains in the phylogenetic trees at the rates 99% and,96% respectively, especially with straine *H. egyptius*.

Also we investigated for the ability of *H. influenzae* to producing biofilm and the results showed that all isolates produced biofilm at the rate 100% but varying in degrees some isolates were strong biofilm producer and some were are moderate biofilm producer other were weak producer.

The last part of the study included using Citrus plant which was Citrus lemon and black dried lemon and Citrus japonica and investigated their alcoholic extracts to inhabit the growth of *H. influenzae* and the results revealed that fresh lemon juice the most effective against *H. influenzae* followed by *C.japonica* and then black dried lemon and this study investigated on the effectiveness of these extracts for the inhibition of the biofilm formation and the results showed that lemon juice the most effectiveness.

The Republic of Iraq
Ministry of Higher Education and
Scientific Research
Mosul University / College of Science
Department of Biology

Morphological and molecular detection of *Heamophilus influenzae* from respiratory tract infections in Mosul city

A Thesis submitted by

Zena Hisham Jassim Hamo Al-Dabbagh

M.SC. Thesis

Biology /Microbiology

Supervised by

Asst. Prof.

Dr. Shakir Ghazi Gergees Al-Mawla

1444 A.H. **2023 A.D.**