جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة الموصل/ كلية العلوم

قسم علوم الحياة

التشخيص المظهري والجزيئي لبكتريا *Serratia marcescens* من مصادرها السريرية والتحري عن قدرتها على التحفيز المناعي

مروة إحسان خليل إبراهيم

أطروحة دكتوراه

علوم حياة / أحياء مجهرية

بإشراف

أ.د محمود عبد الجبار حسين الطوبجي

أ.م.د ريان مازن فيصل العبيدي

1446هـ

2024 م

الخلاصة

تضمنت الدراسة الحالية جمع 152 عينة من حالات مرضية شملت (الحروق والجروح والتهاب المجاري البولية) للفترة من شهر شباط ولغاية حزيران 2023 من المرضى في مستشفى السلام التعليمي والموصل العام والجمهوري التعليمي مركز الموصل التخصصي للحروق والمعالجة التجميلية ومن كلا الجنسين وبأعمار مختلفة. هدفت هذه الدراسة إلى تحديد تأثير الخلايا البكتيرية لـ *S. marcescens* الحية منها والمقتولة وراشح المزرعة البكتيرية على أنواع من الخلايا المناعية في بعض الأعضاء المناعية في المزارع الخلوية، إضافة إلى دراسة تأثيرها على التعبير الجيني لبعض العوامل المناعية في تلك المزارع الخلوية. وأظهرت النتائج أن أعلى نسبة عزل لبكتريا الـ *S. marcescens* كانت في حالة الإصابة بالتهاب المجاري البولية إذ بلغت 4.41 % بواقع ثلاث عزلات من 68 عينة، تلاها حالات من الحروق ثم الجروح وبنسبة 3.62 % و2.17 % على التوالي. وأكّد التشخيص باستخدام جهاز الـ Vitek2 كما أظهرت السلالات المعزولة حساسية تجاه بعض المضادات الحيوية ومقاومة للبعض الاخر. وحدد التسلسل الوراثي للجين 16S rRNA للسلالات المعزولة لغرض تأكيد التشخيص، وأيضا لتحديد وجود سلالات جديدة للبكتريا من خلال تحديد التتابعات لـ DNA وقد سجلت 3 سلالات بكتيرية من مجموع خمس عزلات في بنك الجينات الامريكي العالمي وبنسبة تتطابق بلغت 99.86%. كشفت الدراسة بعد التحليل الجيني لخمسة عزلات بكتيرية عن جينات عوامل الضراوة لـ *phlA* في أربع عزلات وجين *hly* في ثلاث عزلات ولم تظهر جينات باقي عوامل الضراوة. أظهرت الدراسة تحديد تأثير الخلايا البكتيرية الحية والمقتولة وراشح المزرعة البكتيرية على الخلايا المناعية في المزارع الخلوية لبعض الأعضاء المناعية، وأظهرت النتائج ارتفاعاً بأعداد الخلايا المناعية في الطحال والمعرضة للبكتريا الحية وبمقدار 1.2×10^4 خلية / مل بنسبة 500% مقارنة بالسيطرة في حين كان أعدادها 0.6×10^4 وبنسبة بلغت 200% عند تعرضها للخلايا المقتولة و 0.5×10^4 عند تعرضها للراشح البكتيري وبنسبة بلغت 1500% في حين كان تأثير الخلايا الحية على الخلايا لمناعية في العقد اللمفاوية بمقدار 2.0×10^5 خلية / مل وبنسبة 3230% وكان بمقدار 1.1×10^5 و 1.5×10^5 خلية /مل وبنسبة (1730) و (2400) % على التوالي عند تعرضها للخلايا المقتولة وراشح المزرعة البكتيرية على التوالي، ومقارنة بعينات السيطرة التي بلغت تعداد الخلايا فيها بمقدار 0.6×10^4 خلية / مل. وظهرت أعداد الخلايا المناعية في نخاع العظم بمقدار متقارب عند تعرضها للخلايا الحية والمقتولة، وبلغ تقريبا 5.0×10^5 خلية /مل وبنسبة ارتفاع بلغت 42% مقارنة بعينات السيطرة، في حين كانت

أعدادها أقل عند تعرضها للراشح البكتيري أذ بلغ 4.0×10^5 خلية / مل وبنسبة 14.3% التي كان تعداد الخلايا فيها 3.5×10^5 خلية /مل وأظهرت نتائج التعبير الجيني لجينات *CD3* و *cd19* و *GMCSF* و *NFKB* و *IL-6* لخلايا المزارع الخلوية المعرضة للخلايا الحية والمقتولة وراشح المزرعة البكتيرية اختلافات كبيرة مع عينات السيطرة، إذ كان تأثير البكتريا الحية على خلايا نخاع العظم بأعلى تعبير جيني لـ *CD3* ثم *IL-6* وللعامل *GMCSF* ومن ثم لـ *CD19* وأخيرا للعامل *NFKB*.في حين كان تأثير الخلايا المقتولة بأعلى تعبير جيني لـ *IL-6* ومن ثم لـ *CD3* و *GMCSF* و *CD19* و *NFKB* على التوالي. كان تأثر راشح المزرعة البكتيرية في أعلى تعبير جيني للجين *IL-6* ومن ثم لـ *CD3* و *CD19* و *GMCSF* و *NFKB* على التوالي . عند تعرض خلايا العقد اللمفاوية للمعاملة بالخلايا البكتيرية الحية وتحديد التعبير الجني أظهرت النتائج أن أعلى تعبير جيني كان للعامل *GMCSF* وبمقدار 30 ضعفاً وتلاها العامل *NFKB* بمقدار 15 ضعفاً ثم كل من *CD3* و *IL-6* بمقدار 11 ضعفاً وأخيرا الـ *CD19* بمقدار 5 أضعاف مقارنة بعينات السيطرة.

أما نتائج التعبير الجيني للخلايا المناعية في العقد اللمفاوية والمعرضة للبكتريا المقتولة فكان العامل *NFKB* في أعلى تعبير جيني ومن ثم *CD3* بمقدار 10 أضعاف وبمستوى متقارب لكل من *CD19* و *IL-6* و *GMCSF* وكان للراشح البكتيري تأثير على التعبير الجيني للعامل *GMCSF* بمقدار 10 أضعاف، ومن ثم بمقدار أقل لباقي العوامل المدروسة مقارنة بعوامل السيطرة .وظهر التعبير الجيني لـ *GMCSF* للخلايا المناعية في الطحال والمعرضة للبكتريا الحية بأعلى مستوى بلغ بحدود 2000 ضعف وبفارق كبير عن التعبير الجيني لـ *CD19* الذي ظهر بمقدار 120 ضعفاً ومن ثم التعبير الجيني لـ *IL-6* و *CD3* و *NFKB* بمقدار 60 و 45 و 25 ضعفاً على التوالي .ظهر تأثير الخلايا البكتيرية المقتولة على التعبير الجيني لكل من *CD19* و *CD3* و *IL-6* و *NFKB* بمقدار 90 و 40 و 40 و 25 ضعفاً على التوالي في حين ظهر التعبير الجيني للعامل *GMCSF* في الطحال بأعلى مقدار بلغ 1200 ضعف .

وكان تأثير راشح المزرعة البكتيرية على التعبير الجيني للعامل *GMCSF* بأعلى مستوى له بلغ بحدود 400 ضعف في حين بلغ لـ *IL-6* و *CD3* و *CD19* و *NFKB* بمقدار 20 و 15 و 14 و 10 أضعافا على التوالي.

Abstract

The current study included the collection of 152 samples of disease cases including (burns, wounds and urinary tract infection) for the period from February to June 2023 from patients at Al-Salam Teaching Hospital, Mosul General and Al-Jumhuriya Educational Mosul Specialized Center for Burns and Cosmetic Treatment of both sexes and of different ages, this study aimed to determine the effect of live and dead *S. marcescens* bacterial cells and bacterial supernatant on the types of immune cells in some immune organs in cell cultures, in addition to studying their effect on the gene expression of some immune factors in those cell cultures.

The results showed that the highest isolation percentage of *S. marcescens* was from urinary tract infection, accounting to 4.41%, with three isolates from 68 samples, followed by cases of burns and wounds, at a rate of 3.62% and 2.17%, respectively. Bacterial diagnosis was confirmed using the Vitek2 system, and the isolated strains showed sensitivity to some antibiotics and resistance to others. The 16S rRNA gene was used to identify the isolated strains for the purpose of confirming the diagnosis and also to determine the presence of new strains of bacteria by determining the DNA sequences. Three out of five bacterial strains were submitted to Gene Bank, all showing a identity rate of 98%. Genetic analysis of 5 bacterial isolates from this study revealed the presence of *phlA* virulence gene in 4 isolates and *hly* gene in 3 isolates, however, the genes for the rest of the virulence factors studied were not detected. The study showed a determination of the effect of live and dead bacterial cells and bacterial supernatant on immune cells in cell cultures of some immune organs. The results showed an increase in the number of immune cells in the spleen exposed to live bacteria by 1.2 x 10^4 cells/ml by 500% compared to the control, while their number was 0.6 x 10^4 with a rate of 200% when exposed to dead cells and 0.5 × 10^5 cells/ml, at a rate of (1730)% and (2400)%, respectively, when exposed to dead cells and bacterial supernatant, respectively, and compared with control samples in which the cell count reached 0.6 × 10^4 cells/ml. The number of immune cells in the bone marrow appeared at a similar rate when exposed to live and dead cells, reaching approximately 5.0 x 10^5 cells/ml, an increase of 42%

compared to control samples, while their numbers were lower when exposed to bacterial supernatant, reaching 4.0 x 10^5 cells/ml, a rate of 14.3%. The cell count was 3.5 x 10^5 cells/ml. The results of gene expression experiment for *CD3*, *CD19*, *GMCSF*, *NFKB*, and *IL-6* in cell culture cells exposed to live and dead cells and bacterial supernatant showed significant differences with control samples, as the effect of live bacteria on bone marrow cells was with the highest gene expression for *CD3*, then *IL-6* , and for the factor *GMCSF*, then for *CD19*, and finally for *NFKB*. While the effect of dead cells had higher gene expression for *IL-6* and then for *CD3*, *GMCSF*, *CD19*, and *NFKB*, respectively. The bacterial supernatant caused an increase in gene expression for *IL-6* followed by *CD3*, *CD19*, *GMCSF*, and *NFKB*, respectively. When lymph node cells were treated with live bacterial cells and gene expression was determined, the results showed that the highest gene expression was shown in *GMCSF* by 30-fold, followed by *NFKB* by 15-fold, then *CD3* and *IL-6* by 11fold, and finally *CD19* by 5fold compared to control sample. As for the results of gene expression for immune cells in the lymph nodes exposed to dead bacteria, the gene expression for *NFKB* was highest, followed by *CD3* by 10-fold, with a similar level for *CD19*, *IL-6* , and *GMCSF*. The bacterial supernatant had an effect on gene expression for *GMCSF* by 10-fold, and then to a lesser extent for the rest of the studied factors compared to the control factors. The gene expression of *GMCSF* of immune cells in the spleen exposed to live bacteria appeared at the highest level, reaching approximately 2000-fold, with a significant difference from the gene expression of *CD19*, which appeared at a rate of 120fold, and then the gene expression of *IL-6* , *CD3*, and *NFKB*, at a rate of 60, 45, and 25fold, respectively. The effect of dead bacterial cells on the gene expression of *CD19*, *CD3*, *IL-6* , and *NFKB* appeared to be increased 90, 40, 40, and 25fold, respectively, while the gene expression of *GMCSF* in the spleen appeared to be 1200 fold higher. The effect of the bacterial supernatant on the gene expression of *GMCSF* was at its highest level, reaching about 400-fold, while for *IL-6* , *CD3*, *CD19*, and *NFKB*, it was 20, 15, 14, and 10-fold, respectively.

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

Morphological and Molecular Identification of *Serratia marcescens* from clinical Sources and Investigate its role in Immunity Response

Marwa Ihsan Khalil Ibrahim

Ph.D.Thesis

In

Biology / Microbiology

Supervised By

Professor
Dr.Mahmoud Abdul-Jabbar Hussein
Al-Tobji

Assistant Professor
Dr.Rayan Mazin Faisal Al-
Obaidy

2024 A.D

1446 A.H