



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الموصل
كلية العلوم

التحري عن المسببات البكتيرية لالتهاب الجيوب الأنفية المزمن وقدرتها
على إنتاج دقائق الفضة النانوية والكشف جزيئياً عن جين *mrk A*

أطروحة مقدمة إلى

مجلس كلية العلوم في جامعة الموصل وهي جزء من متطلبات نيل شهادة

دكتوراه فلسفة في اختصاص

علوم الحياة / علم الأحياء المجهريّة

من قبل

إيناس عبد المنعم حسين محمد الليلة

بإشراف

الأستاذ الدكتورة باسمّة احمد عبد الله الياس

الخلاصة

جُمعت (35) عينة من حالات التهاب الجيوب الانفية المزمن والخاضعين لعملية التنظير الأنفي خلال الفترة من آذار 2013 ولغاية آذار 2014 من مستشفيات الجمهوري، الربيع الأهلي و الزهراوي الأهلي في مدينة الموصل. شخصت العزلات اعتماداً على الاختبارات الكيموحيوية بالإضافة إلى اختبارات API Staph ، RapID™ ONE System وAPIE20.

كانت أعلى نسبة للنوع *Escherichia coli* في الإناث وبلغت (15%) بينما كانت أعلى نسبة في الذكور للنوع *Klebsiella pneumoniae* وبلغت (13.3%) كما عزلت أيضاً الأنواع *Serratia marcescens* ، *Moraxella spp.* ، *Citrobacter freundii* ، *Staphylococcus capitis* ، *Staph. saprophyticus* ، *Staph. lugdunensis* و *Staph. sciuri* بنسبة (6.7%) في الذكور أما في الإناث فقد عزلت الأنواع :

Enterobacter ، *Enterobacter aerogenes* ، *Acinetobacter lwoffii* ، *Staph. epidermidis* ، *Serratia marcescens* ، *Proteus mirabilis* ، *Cloacae* ، *Staph. xylosum* ، *Staph. warneri* ، *Staph. hominis* بنسبة (5%).

أبدت جميع الأنواع الجرثومية المعزولة حساسية للمضادين Norfloxacin (NOR₁₀) و Ciprofloxacin (CIP₁₀) يليهما المضادان Gentamicin و Imipenem وأثرت المضادات Cloxacillin (CX₁₀) ، Cephalothin (KF₃₀) ، Cefotaxime (CTX₁₀) ، Cefixim (CFM₅) و Cefatazidime (CAZ₁₀) بنسب مختلفة بينما كانت جميع العزلات مقاومة للمضادات Amoxicillin/Clavulanic acid (AMC₃₀) ، Ampicillin (AM₂₅) ، Ampicillin/ Cloxacillin (APX₃₀) ، Carpenicillin (PY₂₅) ، Amoxicillin (AX₂₅) ، Erythromycin (E₁₅) و Meropenem (MEM₁₀) ، Penicillin (10U).

تم قياس نسبة الكلوبولين المناعي الكلي IgE إذ بلغت في المرضى الذين كانت نسبة الكلوبولين المناعي الكلي IgE لديهم مرتفعة (46.7%) و (45%) في الذكور والإناث على التوالي، كما تم التحري عن الغشاء الحيوي والجراثيم في الخزع النسيجية المأخوذة من الزوائد الانفية للمرضى قيد الدراسة إذ كانت نسبة وجود الغشاء الحيوي والجراثيم (17.14%) في العينات جميعاً.

تم التحري عن قدرة الأنواع المعزولة لبناء دقائق الفضة النانوية إذ استطاع النوعان *E. coli* و *Prot. mirabilis* بناء هذه الدقائق والتي شخصت باستخدام طيف الأشعة تحت الحمراء وجهاز محلل زيتا Zeta analyzer إذ أظهرت جرثومة *E. coli* القدرة على تكوين نوعين من الدقائق النانوية الأولى بحجم (0.006) نانوميتر والأخرى حوالي (1) نانوميتر في محلول نترات الفضة بتركيز (5) مولار بينما كونت نوع واحد بحجم اقل من (1) نانوميتر في محلول نترات الفضة بتركيز (3) مولار، استطاع النوع *Prot. mirabilis* تكوين ثلاثة أنواع من الدقائق النانوية الأولى حجمها اقل من (0.002) نانوميتر والثانية حجمها (0.1) نانوميتر أما الثالثة فكان حجمها (1) نانوميتر في محلول نترات الفضة بتركيز (5) مولار وكونت نوعاً واحداً بحجم (0.1) نانوميتر في محلول نترات الفضة بتركيز (3) مولار. كذلك اختبرت الفعالية التثبيطية للمحلول المتكون من قبل الجرثومتين على باقي الجراثيم المعزولة إذ لوحظ أن المحاليل تثبتت نمو الجراثيم الآتية: *Citro. freundii*, *E.coli*, *Prot. mirabilis*, *Staph. epidermidis*, *Staph.hominis*, *Staph.lugdunensis*, *Staph.warneri*

أما النوع *Enter.cloaceae* تم تثبيط نموه من قبل المحاليل ماعدا المحلول (7-3M) ، والأنواع (*Kleb.pneumoniae*, *Moraxella spp.*, *Staph.xylosus*) أبدت حساسية متوسطة للمحاليل المختبرة وقاومت الأنواع (*Acineto.lowffii*, *Enter.aerogenes*, *Serr.marcsense*, *Staph.capitis*, *Staph.saprophyticus* *Staph.,sciuri*) المحاليل المختبرة .

اجري فحص تفاعل البلمرة المتسلسل باستخدام عزل البلازميد من الأنواع المعزولة واجري فحص سلسلة تفاعلات البلمرة باستخدام البادئات الخاصة للتحري عن جين *mrkA* إذ وجد الجين في (4) أنواع وهي : *Moraxella spp.*, *Entero. aerogenes*, *E. coli*, *Citro. freundii* .

قورنت نتائج تتابعات القواعد النروجينية للجين *mrkA* ضمن المركز الدولي لمعلومات التقنيات الحياتية (NCBI) National Center Biotechnology Information وباستخدام برنامج (BLAST) Basic Local Alignment Search Tool حيث وجد تغاير ظهر بشكل طفرات من نوع استبدال مما أدى إلى تبدل الحامض الاميني التريتوفان إلى الليوسين كما حدثت طفرة انتقال وتبدل الحامض الاميني الاسبارتيت إلى الاسبارجين .

**Ministry of Higher
Education and Scientific
Research
University of Mosul
College of Science**



**Detection of Bacterial Etiology of Chronic
Rhinosinusitis and its Ability to Produce Silver
Nanoparticles and Molecular Detection of *mrk A*
Gene**

**A Thesis Submitted to the Council of College Of Science /
University of Mosul in Partial Fulfillment of the
Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy
In
Biology / Micobiology**

**By
Enas Abdul-Muniem H. Al-Layla**

**Supervised by
Prof. Dr. Basima Ahmed A. Elias**

Abstract

Thirty five samples were collected from chronic sinusitis patients under endoscopic sinus surgery who were admitted to AL-Jumhuri, AL-Rabie private, AL-Zahrawi private hospitals in Mosul city from March 2013 to March 2014. All isolates were identified to species level depending on morphological, biochemical and physiological tests and using RapID™ ONE System Panel, API Staph and API E20 kits. The high percentage of *Escherichia coli* species were in females it was (15%) while *Klebsiella pneumoniae* were in males (13.3%).

The following species were isolated from males too:-

Citrobacter freundii, *Moraxella spp.*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus capitis*, *Staph. lugdunensis*, *Staph. saprophyticus* and *Staph. sciuri* in ratio (6.7%) for each species, while in females :- *Acinetobacter lwoffii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Staph. epidermidis*, *Staph. hominis*, *Staph. warneri* and *Staph. xylosus* in ratio (6.7%) too.

All isolated species were sensitive to Norfloxacin(NOR₁₀) and Ciprofloxacin(CIP₁₀) followed by Gentamicin(CN₁₀) and Imipenem(IMP₁₀). The species were sensitive to following antibiotics in different ratios :Cefotaxime(CTX₁₀), Cephalothin(KF₃₀), Cloxacillin(CX₁₀), Cefatazidime(CAZ₁₀) and Cefixim(CFM₅), While all isolates were resistant to Ampicillin(AM₂₅), Amoxillin/Clavulanic acid(AMC₃₀), Ampicillin/Cloxacillin(APX₃₀), Amoxillin(AX₂₅), Carpenicillin(PY₂₅), Meropenem(MEM₁₀) and Erythromycin(E₁₅).

Total IgE was estimated and the high percentages was (46.7%), (45%) in males and females respectively. Biofilm was existed in nasal polyps biopsies at (17.14%).

The ability of species to biosynthesize silver nanoparticles(SNP) was investigated too. *E. coli* and *Prot. mirabilis* synthesized SNP and identified by using FTIR and Zeta analyzer, *E. coli* biosynthesized two types of nanoparticles, the first is in (0.006)nanometer and the other in (1)nm in silver nitrate solution(5)Mollar, while the same bacteria biosynthesized one type with size less than (1)nm in silver nitrate solution(3)Mollar.

Prot. mirabilis biosynthesized three types of nanoparticles, the first is at (0.002)nm, the second is at(0.1)nm and the third is at (1)nm in silver nitrate

solution(5)Mollar, while the same bacteria biosynthesized one type (0.1)nm in silver nitrate solution(3)Mollar.

The antibacterial activity of synthesized silver nanoparticle solutions were tested against following bacterial species:- *Citro. freundii*, *E.coli*, *Proteus mirabilis*, *Staph. epidermidis*, *Staph.hominis*, *Staph.lugdunensis*, *Staph.warneri*.

Entero. Cloaceae was inhibited by all solutions except (7-3M),while *Kleb.pneumoniae*, *Moraxella spp.*and *Staph.xylosus* were moderate sensitive to tested solutions and *Acineto.lowffii*, *Enter.aerogenes*, *Serr. marcescens*, *Staph.capitis*, *Staph.saprophyticus* and *Staph.,sciuri* were resistant to tested solutions.

PCR was done using plasmids isolated from species under study using primers for *mrkA* gene .It was found in four species *Moraxella spp.*, *Enterobacter aerogenes*, *E. coli* and *Citrobacter freundii*.

Finally nucleotides sequencing were done for isolated *mrkA* gene and homology searches were conducted between the sequences of standard gene BLAST program which is available at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and Basic Local Alignment Search program Tool(BLAST).We found variations appear as Transversion mutation which cause change Tryptophan amino acid to Leucine and there was Transition mutation which cause change Aspartite amino acid to Asparagine.