



جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة الموصل / كلية العلوم

اخماد استشعار النصاب باستخدام فيتامين C لبكتريا

Klebsiella pneumoniae المعزولة من حالات تجرثم الدم

وتتميطها جزيئياً بالترحيل الكهربائي للهلام ذو الحقل النبضي.

رسالة يونس محمود احمد

رسالة ماجستير

علوم الحياة / الاحياء المجهرية

بإشراف

الأستاذ المساعد

الدكتورة غادة عبد الرزاق محمد إبراهيم

الخلاصة

تُعَدُّ الإصابة بتجرثم الدم Bacteremia من الحالات الحرجة والمهددة للحياة. في هذه الدراسة، تم جمع 250 عينة دم من المرضى المشكوك بإصابتهم بتجرثم الدم في مدينة الموصل (مستشفى الموصل العام، ومستشفى ابن سينا التعليمي و مركز الحروق التخصصي - مستشفى الجمهوري، مستشفى السلام) للمدة ما بين آب إلى تشرين الأول 2024 . زُرعت مباشرة في وسط "مرق نقيع المخ والقلب" (Brain Heart Infusion Broth) وعُدَّ هذا زرعاً أولياً. وحضنت لمدة سبعة ايام وتمت ملاحظة اي تغيرات ضمن هذه المدة . تم إجراء زرع ثانوي subculture على وسطي: آكار الدم وآكار الماكونكي . وبعدها تم التشخيص الجزيئي للمستعمرات النقية النامية اعتماداً على الجين التشخيصي 16Sr RNA . تم تشخيص 19 سلالة بكتيرية سالبة لصبغة كرام بنسبة 7.6% و 16 سلالة بكتيرية موجبة لصبغة كرام بنسبة 6.4%. عزلت *K. pneumoniae* بواقع ست سلالات بكتيرية سميت (R6 ,R5 ,R4 ,R3, R2,R1) وكانت الاعلى من حيث البكتيريا السالبة لصبغة كرام، وقد تم تحديد تحت النوع لها من خلال اختبار فوكس بروسكاور واختبار استهلاك المالونات. وظهر أن النمط الفرعي السائد في هذه الدراسة هو *K. pneumoniae subsp. Ozaenae* في 5 سلالات بينما سلالة واحدة كانت تابعة لتحت النوع *K. pneumoniae subsp. pneumoniae* .

فضلاً عن ذلك تم إيجاد العلاقة بين الإصابة بتجرثم الدم ووظائف كل من الكلى و القلب فقد أُجري فحص اليوريا و الكرياتينين للكلى و اجريت الفحوصات Lactic Dehydrogenase (CPK) (LDH) Creatine Phospho Kinase و Creatine Kinase MB (CKMB) و Troponin للقلب لدى المرضى المصابين بتجرثم الدم، ومقارنتها بأفراد أصحاء كمجموعة سيطرة. أظهرت التحليلات الإحصائية عدم وجود فروق معنوية في وظائف الكلى بين المرضى والأشخاص الأصحاء، ووُجِدَتْ فروقات معنوية في وظائف القلب بين المرضى والأشخاص الأصحاء فقد ظهر انخفاض عند فحصي CPK و CKMB عند مستوى المعنوية اقل من 0.01 .

تم الكشف عن نظام استشعار النصاب في سلالات *K. pneumoniae* باستخدام الطريقة المظهرية باستخدام الوسط نصف الصلب وبالاستعانة بالمستشعر الحيوي *Agrobacterium tumefaciens* لإنتاج جزيئات (AHLs) N-acyl-L-homoserine lactones طويلة السلسلة و تبين أن جميع السلالات لها القدرة على انتاجها ، فقد ظهرت المستعمرات زرقاء اللون . تعد هذه الدراسة الاولى محلياً وعالمياً التي بحثت في ظاهرة إخماد استشعار النصاب (Quorum Quenching) باستخدام فيتامين

C حيث عرضت السلالات البكتيرية لتراكيز مختلفة منه (10,5,1 ملغم/100 سم³) خلال ثلاث مراحل من نموها البكتيري. وتم تقييم التأثير المثبط من خلال ملاحظة تغير لون المستعمرات البكتيرية. أظهر فيتامين C نشاطاً في تثبيط جزيئات الإشارة ، ففي مرحلة التمهيد أظهرت سلالتان فقط (R6, R5) نمواً على شكل مستعمرات بيضاء عند جميع التراكيز، بينما لم تنم باقي السلالات إطلاقاً. وفي مرحلة النمو في طور اللوغارتمي أظهرت أربع سلالات وهي (R3, R4, R5, R6) نمواً أبيض اللون عند التركيز (1 ملغم/100 سم³)، و نمت سلالتان فقط (R6, R5) عند التركيزين (5 و 10 ملغم/100 سم³). وبالنسبة لمرحلة طور التوقف نمت جميع السلالات الست كمستعمرات بيضاء عند تركيز (1 ملغم/100 سم³) ، في حين انخفض النمو تدريجياً مع زيادة تركيز فيتامين C، فقد نمت ثلاث سلالات فقط (R6, R5, R3) عند (5 ملغم/100 سم³)، وسلالتان عند (10 ملغم/100 سم³) .

وفي تجارب لتنميط لسلالات *K. pneumoniae* المعزولة محلياً فقد تم اجراء نوعين من التنميط للتعرف على النمط المصلي للمحفظة (K) باستخدام بادئات الجينات المشفرة الخمسة K1, K2, K20, K5, K54 وباستخدام تقنية ال Multiplex PCR وقد تبين أن نمط المحفظة السائد هو K2 في السلالات الستة لبكتيريا *K. pneumoniae* من بين الأنماط الخمسة بظهور الحجم الجزيئي 641 bp . أما النوع الثاني من التنميط الذي استخدم في الدراسة فهو بالاعتماد على تقنية Pulsed-Field Gel Electrophoresis Analysis (PFGE) و باستخدام الإنزيم القاطع *ApaI* لمعرفة مدى التقارب والتشابه الجزيئي بين هذه السلالات وكانت النتيجة ظهور أنماط مختلفة انبثقت من تكوين 42 قطعة DNA تراوحت أحجامها المتكونة من (50-850) kb وتمت الاستعانة ببرنامج software version 5 PAST برسم الشجرة الوراثية التي اسفر عنها ان السلالتين R3 - R2 كانتا متشابهتين بنسبة 95% و السلالتان R5-R6 كانت نسبة تشابههم 65%.

Abstract

Bacteremia is considered a critical and life-threatening condition. In this study, 250 blood samples were collected from patients suspected of having bacteremia in the city of Mosul (Mosul General Hospital, Ibn Sina Teaching Hospital, the Specialized Burns Center - Al-Jumhuri Hospital, and Al-Salam Hospital), for the period from August to October 2024. The samples were immediately cultured in Brain Heart Infusion (BHI) broth, considered the primary culture, and incubated for seven days with daily observation for any changes during this period. Secondary subcultures were performed on Blood Agar and MacConkey Agar media. Subsequently, molecular identification of the pure bacterial colonies was conducted based on the diagnostic 16S rRNA gene.

19 Gram-negative bacterial strains (7.6%) and 16 Gram-positive bacterial strains (6.4%) were identified. Among the Gram-negative isolates, *Klebsiella pneumoniae* was the most prevalent, with six bacterial strains labeled (R1, R2, R3, R4, R5, R6). Subspecies identification was performed using the Voges-Proskauer test and malonate utilization test. The predominant subspecies was identified as *K. pneumoniae* subsp. *Ozaenae* in five isolates, while one isolate belonged to *K. pneumoniae* subsp. *pneumonia*.

Additionally, the relationship between bacteremia and the functions of both the kidneys and the heart was investigated. Kidney function was assessed through urea and creatinine levels, while cardiac function was evaluated using Lactic Dehydrogenase (LDH), Creatine Phosphokinase (CPK), Creatine Kinase-MB (CKMB), and Troponin tests. These values were compared with those from healthy individuals as a control group. Statistical analysis revealed no significant differences in kidney function between patients and healthy controls. However, there were statistically significant differences in cardiac function, as evidenced by reduced CPK and CKMB levels ($p < 0.01$) in patients compared to controls.

Quorum sensing (QS) systems in *K. pneumoniae* strains were examined phenotypically using Semi-solid medium and the biosensor *Agrobacterium tumefaciens* to detect long-chain N-acyl-L-homoserine lactones (AHLs). All isolates showed the ability to produce these signaling molecules, indicated by the appearance of blue-colored colonies. This study is the first, both locally and globally, to investigate the phenomenon of Quorum Quenching using vitamin C, wherein bacterial strains were exposed to different concentrations of vitamin C (1, 5, 10 mg/100ml) during three distinct phases of their bacterial growth.

To investigate quorum qu, bacterial isolates quenching, ere exposed to different concentrations of vitamin C (1, 5, and 10 mg/100 ml) during three bacterial growth phases. The inhibitory effect was evaluated by observing color changes in the bacterial colonies. Vitamin C demonstrated signal molecule inhibition activity. In the lag phase, only two strains (R5 and R6) exhibited white colonies at all concentrations, while the remaining strains showed no growth. During the logarithmic phase, four strains (R3, R4, R5, R6) showed white colonies at 1 mg/100 ml, and only two strains (R5, R6) grew at 5 and 10 mg/100 ml. In the stationary phase, all six strains grew as white colonies at 1 mg/100 ml, while growth decreased with higher vitamin C concentrations: three strains (R3, R5, R6) grew at 5 mg/100 ml, and only two strains (R5, R6) at 10 mg/100 ml.

For the molecular typing of locally isolated *K. pneumoniae* strains, two approaches were used to determine one of them to identify the capsular (K) serotypes. This approach involved multiplex PCR using primers for five capsular serotype genes (K1, K2, K5, K20, K54). The results indicated that the predominant capsular type was K2, with a molecular band size of 641 bp present in all six strains. The second approach involved Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) analysis using the restriction enzyme *ApaI* to assess genetic similarity among the strains. The analysis produced different patterns, comprising 42 DNA fragments ranging from 50 to 850 kbp. Phylogenetic tree



C

construction using PAST software version 5 revealed that strains R2 and R3 shared 95% genetic similarity, indicating the highest relatedness, while R5 and R6 shared 65% similarity.

University of Mosul

College of Science

Dep.of Microbiology



Quorum quenching using vitamin C for *Klebsiella pneumoniae* isolated from bacteremia and molecular typing by pulsed field gel electrophoresis

Rusliya Younis Mahamuod Ahmed

M.Sc. Thesis

Biology /Microbiology

Supervised By

Asst. Prof. Dr. Ghada Abdul-Razzag Mohammad Ibrahim

1447 A.H

2025 A.D