جامعة الموصل

كلية العلوم

دراسة مناعية لتركيب متعددة السكريات الدهنية لبعض البكتريا السالبة لصبغة كرام

مصطفى غانم إسماعيل الراوي

رسالة ماجستير

علوم الحياة / الأحياء المجهرية

بإشراف

الأستاذالدكتورة أديبة يونس شريف حمو النعمان

1438 هـ

2017 م

الخلاصة

تم في هذه الدراسة عزل وتشخيص بعض أنواع البكتريا السالبة لصبغة كرام من عينات شملت مسحات من الجروح والحروق والدمامل من المرضى الراقدين والوافدين إلى مستشفى الجمهوري التعليمي إذ جمعت 90 عينة أعطت 52 عينة منها نموا للبكتريا السالبة لصبغة كرام أي بنسبة 57.8% شخصت الأنواع البكتيرية بالاعتماد على الفحوصات المظهرية والكيموحيوية والفسلجية وأظهرت النتائج عزل الأنواع:

Proteus mirabilis (10%) , *Citrobacter freundii* (2.22 %)
Proteus vulgaris (3.33%) , *Pseudomonas aeruginosa* (6.66%)
Klebsiella pneumoniae (7.77%) , *Pseudomonase luteola* (2.22%)
Klebsiella spp (3.33%) , Enterobacter spp (7.77%)
Citrobacter spp (6.66%) ، Escherichia Coli (5.55%)
Citrobacter braakii (2.22%)

تم استخلاص مادة متعددة السكريات الدهنية باستخدام مادة EDTA من بكتريا *E.coli* , *Proteus mirabilis* و *Pseudomonas aeruginosa* و تم حقنها في الارانب لانتاج الاجسام المضادة لها.

وتم اختبار تأثير متعدد السكريات الدهني Lipopolysaccharide المستخلص من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* في الاستجابة المناعية للفئران البيض السويسرية المحقونة بها . وقد بينت هذه الدراسة ارتفاعاً في معدلات التعداد الكلي لكريات الدم البيض أما التعداد التفريقي فقد لوحظ حدوث ارتفاع في معدلات الخلايا اللمفاوية والوحيدة وانخفاض في معدلات العدلات وتباين في معدلات الحمضات في الفئران المعاملة وزيادة الاستجابة المناعية غير المتخصصة المتمثلة بزيادة معدلات معامل البلعمة في الفئران المعاملة .

كما تضمّنت الدراسة اختبار قابلية الجراثيم على تكوين المادة المخاطية بطريقة الأنبوب وأظهرت النتائج أن بكتريا *Proteus mirabilis* أعطت أعلى قدرة لتكوين المادة المخاطية بينما أعطت كل من بكتريا *E.coli* و *Pseudomonas aeruginosa* نتيجة موجبة ضعيفة.

كما اظهرت العزلات قدرتها للالتصاق على الخلايا الطلائية للإنسان المعزولة من الإدرار، فيما انخفض معدل الالتصاق البكتيري باستخدام أضداد مستخلص LPS, وأظهرت النتائج أن معدل التصاق البكتريا بالخلايا الطلائية للإنسان بلغ 48.2 خلية بكتيرية / خلية طلائية للبكتريا *P.mirabilis* و33.3 خلية بكتيرية / خلية طلائية للبكتريا *P.aeruginosa*

و18.9 خلية بكتيرية / خلية طلائية للبكتريا *E.coli* وأظهرت الأضداد المتخصصة للـ LPS تأثيراً مثبطاً واضحاً لالتصاق هذه العزلات البكتيرية بالخلايا الطلائية للإنسان, إذ بلغ معدل الالتصاق بعد المعاملة بالأضداد 24.4 خلية بكتيرية / خلية طلائية للـ *P.mirabilis* و14.4 خلية بكتيرية / خلية طلائية للبكتريا *P.aeruginosa* و7.3 خلية بكتيرية / خلية طلائية للبكتريا *E.coli*.

كما تم اختبار فعالية الأجسام المضادة لمادة متعدد السكريات الدهني المستخلص من بكتريا *E.coli* في شفاء الجروح المحدثة للفئران و المخمجة ببكتريا *E.coli* والمحدثة داخل الجسم الحي للفئران, وقد أظهرت النتائج تأثيراً جيداً للأضداد في إزالة الخمج البكتيري من الجروح التجريبية, إذ حصل الشفاء في اليوم الثالث عشر بالمقارنة مع فئران السيطرة الموجبة (المعالجة بالمضاد الحيوي Gentamycin) التي حصل فيها الشفاء في اليوم الثامن, وفئران السيطرة السالبة غير المعالجة التي حصل فيها الشفاء في اليوم الحادي والعشرين.

University of Mosul
College of Sciences

Immunological study of Lipopolysaccharide structure in some Gram negative bacteria

Mustafa Ghanem Ismail Al-Rawy

M.Sc. Thesis
Biology / Microbiology

Supervised by
Professor Dr.Adeeba Y. Sh. Alnuaman

2017A.D. **1438A.H.**

Summary

The study deals with the isolation and identification of some types of Gram negative bacteria from different samples including wound , burn and ulcers from inpatients and out patients attending the teaching hospital .Ninty samples were collected , 52 samples showed positive result for the negative bacteria percentage of 57.7% , the biochemical and morphological characteristic were used to identify the isolates .the result showed that the isolatedbacteria were

Proteus vulgaris (3.33%) , *Proteus mirabilis* (10%)
Klebsiella spp (3.33%) , *Klebsiella pneumoniae* (7.77%)
E.coli (5.55%) , *Citrobacter braakii* (2.22%)
Citrobacter freundii (2.22 %) , *Pseudomonas aeruginosa* (6.66%)
Enterobacter spp (%7.77) , *Pseudomonase luteola* (2.22%)
Citrobacter spp (6.66%)

Lipopolysaccharide (lps) was extracted from the isolates E.coli, Pseudomonas aeruginosa and Proteus mirabilis using EDTA, and the effect of the lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa* was studied on the immune response of mice treated with Lps compared with untreated mice (control). Total and defferential WBC count of peripheral blood and innate immune response represented by the phagocytic index were the criteria taken in to consideration.

Result showed a significant increase in the total white blood cell count in the blood of mice treated with Lps with an increase in lymphocyte and Monocyte, and a decrease in neutophile and variation in Eosinophile was noticed in Blood films of Lps treated mice basophile was observed only in the Blood films of mice treated with concentration of 10 Mg/20g, An increase in the Non specific immune response was

noticed through the increase of the phagocytic index. Also this study include the investigation of the ability of isolates for biofilm production using the test tube method, the results showed that *Proteus mirabilis* was highest biofilm producing bacteria followed by *E.coli* while *Pseudomonas aeruginosa* showed weak result. this study also investigated the ability of isolates to adhere to the epithelial cells isolated from urin of normal female and also and also the inhibition of the adhesion by using Anti Lps Antibody, which was obtained by the immunization of the rabbit with Lps, and the adhesion test was repeated after treatment of bacterial isolates *E.coli*, *Proteus mirabilis* and *Pseudomonas aeruginosa* with antibodes for Lps and the result showed that the rate bacterial adhesion on epithelial cells of human was 48.2 bacterial cell/epithelial cell for Proteus mirabilis, 33.3 bacterial cell/epithelial cell for *Pseudomonas aeruginosa* and 18.9 bacterial cell/epithelial cell for E.coli befor treatment with Antibodies while specific Antibodies for Lps showed obvious inhibitory effect on adhesion of these bacteria to human epithelial cells while the adhesion result after treatment with Antibodies were 24.4 bacterial cell/epithelial cell for *Proteus mirabilis*, 14.4 bacterial cell/epithelial cell for *Pseudomonas aeruginosa* and 7.3 bacterial cell/epithelial cell for E.coli. also to investigate the antimicrobial activity of specific Antibody for Lps on the healing of *Escherichia coli* in vivo of experimentally infected wound in mice. The Antibody showed a good antibacterial effect on the experimental wound as healing occurs during 13 days compared with the antibiotic Gentamycin (positive control) which causes the healing of wound after 8 days while the healing occure through 21 days with negative control (without treatment).