جامعة الموصل

كلية التربية للعلوم الصرفة

دراسة تشخيصية ووراثية جزيئية للبكتريا المعزولة من التهابات القناة التنفسية في الانسان

رواء ججي سالم زاكي

رسالة ماجستير

علوم الحياة / الاحياء المجهرية

بإشراف

الأستاذ

الدكتور خالد دحام احمد

الخلاصة

في هذه الدراسة تم جمع (25) عزلة بكتيرية من عينات قشع المرضى الذين يعانون من التهابات القناة التنفسية من مستشفى ابن سينا التعليمي في مدينة الموصل لمدة ثلاثة شهور من اب لغاية تشرين الاول من عام 2013 . شخصت البكتريا المعزولة باستخدام الصفات الشكلية و الزرعية وكذلك الاختبارات الكيموحيوية. وأظهرت النتائج أن هذه العزلات تعود الى ستة انواع بكتيرية مختلفة وهي *Staphylococcus aureus*، *Streptococcus pneumoniae*، *Moraxella cattarhalis*، *Escherichia coli*، *Klebsiella pneumoniae* و *Pseudomonas aeruginosa* وبالنسب الاتية (64%، 12%، 8%، 8%، 4%، 4%) على التوالي وان البكتريا الموجبة لصبغة كرام كانت الاكثر شيوعا من تلك السالبة لصبغة كرام .

اختبرت مقاومة العزلات البكتيرية قيد الدراسة لاثنى عشر مضاداً حيوياً وهي أمبسيلين (Ap) ، سيفالكسين (Cf)، كلورامفينيكول (Cm) ، ارثرومايسين (Ery) ، جينتامايسين (Gen) ، الميثيسلين (Met)، حامض ناليدكسك (Nx) ، نوفوبايوسين (Nov)، ريفامبسين (Rf)، ستربتومايسين (Sm) ، تتراسايكلين (Tc) و ترايمثبريم (Tri) فضلاً عن اربعة املاح من المعادن الثقيلة وهي كلوريد الكادميوم $CdCl_2$ ،كلوريد الكوبلت $CoCl_2$، كلوريد الزئبق $HgCl_2$ وكبريتات الخارصين $ZnSO_4$. تباينت العزلات البكتيرية في مقاومتها للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة المستخدمة. معظم العزلات اظهرت مقاومة متعددة لاكثر من مضاد حيوي وكان مضاد الجنتامايسين هو الاكثر تأثيرا على غالبية العزلات بينما قاومت جميع العزلات حامض النالدكسيك بنسبة 100%. أما بالنسبة لاملاح للمعادن الثقيلة فان جميع العزلات ابدت مقاومة لكلوريد الكوبلت وبنسبة 100%.

أُجريَ توصيف جزئي لمحتوى الـDNA البلازميدي لاربعة انواع من البكتريا المعزولة إذ استخلص المحتوى منها بأستخدام طريقة التحلل القاعدي ورحل كهربائيا في هلام الاكاروز بتركيز (0.7%) وكانت النتائج وجود انماط بلازميدية مختلفة فيها.

ولكون عدد عزلات بكتريا *S. aureus* تشكل النسبة الاكبر (64%) من مجموع العزلات قيد الدراسة فقد تم التوسع في دراستها وراثيا حيث استخدمت تقانة تفاعلات مؤشرات التضاعف العشوائي Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD-PCR) للكشف عن مدى التباين الوراثي ما بين هذه العزلات باستخدام خمس من البادئات العشوائية إذ تبين بأن هناك تبايناً وراثياً ملحوظا ما بين هذه العزلات على الرغم من عزلها من بيئة واحدة الا وهي التهابات القناة التنفسية في الانسان. فضلا عن ذلك فقد عينت مواقع الجينات مانحة المقاومة للمضادات الحيوية في احدى عزلات *S. aureus* قيد الدراسة(التي تظهر مقاومة لمعظم المضادات الحيوية المستخدمة) وذلك باستخدام التحول الوراثي لسلالة *E. coli*

القياسية بالـ DNA البلازميدي المستخلص من عزلة *S.aureus* اعلاه . بينت النتائج ان الجينات مانحة المقاومة للمضادات(حامض ناليدكسك (Nx) و أرثرومايسين (Ery) و الامبسيلين(Ap) و تراي ميثبريم (Tri) و نوفوبايوسين(Nov)) واقعة على الـ DNA البلازميدي لها وبلغ تردد التحول 0.38×10^{-7}.

Abstract

In this study a total of twenty five bacterial isolates were collected from sputum specimens of patients suffering from respiratory tract infections in Ibn-Senia training hospital in Mosul city for three months from August to October 2013. The isolated bacteria were identified using morphological and cultural characters in addition to the biochemical tests. The results revealed that these isolates belong to six different species, these are *Staphylococcus aureus Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella cattarharlis, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae and Pseudomonas aerugonisa* with the following ratios 64%, 12%, 8%, 8%, 4% and 4% respectively. Also, the Gram positive bacteria appear to be more prevalent than that of Gram negative .

The resistance of bacterial isolates understudy were tested against 12 antibiotics ,these are Ampicillin (Ap),Cehpalohexin (Cf), Chloramphenicol (Cm), Erythromycin (Ery), Gentamycin (Gen), Methicillin (Met), Nalidixic acid(Nx), Novobiocin (Nov),Rifampicin (Rif), Streptomycin (Sm),Tetracycline (Tc) and Trimethprim (Tri). In addition to the salts of the following heavy metals, Cadmium chloride ($CdCl_2$), Cobalt chloride ($CoCl_2$), Mercury Chloride ($HgCl_2$) and Zinc sulphate ($ZnSo_4$). The bacterial isolates were differ in their resistance to the used antibiotics and heavy metals . Most of the isolates showed multi-drug resistance and the Gentamycin appear to be more effective on most of the isolates while all the isolates showed resistance to Nalidixic acid with 100% percent and all the isolates were resistant to $CoCl_2$ with 100% percent ratio.

Partial characterization of plasmid DNA content of four bacterial species were carried out. Plasmid DNA was extracted using alkaline lysis method and electorphorised in agarose gel (0.7%). The results showed various plasmid profiles.

Because the number of *S. aureus* isolates represent the biggest percent ratio of the total isolates(64%), more genetic study was performed. Random amplification polymorphic of DNA strand depending on PCR technique using five random primers, was used to detect the phylogenetic relationships among these bacterial isolates.There was a remarkable genetic diversity among the isolates although they were obtained from the same environment (respiratory tract infections in human) . In addition, the locations of antibiotic resistance genes were determined in one of the *S. aureus* isolate understudy(that reveal more resistance to antibiotics used) by genetic transformation of the standard *E. coli* by the plasmid DNA extracted from the above *S. aureus*. The results showed that the genes conferring resistance to Nalidixic acid (Nx), Erythromycin (Ery), Ampicillin (Ap), Trimethprim (Tri), Novobiocin (Nov) are located on its plasmid DNA with transformation frequency 0.38×10^{-7}.

Diagnostic and Molecular Genetic Study for Bacteria Isolated from Respiratory Tract Infections in Human

A Thesis Submitted

By

Rawaa Jaji Salim Zaki

To

The Council of The College of Education for Pure Science University of Mosul In Partial Fulfillment of Requirements for the Degree of M.Sc. In

Microbiology

Supervised by

Professor

Dr. Khalid Daham Ahmed

2015 A.D. **1437A.H.**