جامعة الموصل

كلية العلوم

التوصيف الجزيئي للجينين *ply* و *hlys* في جرثومة *Streptococcus pneumoniae* المعزولة من عينات سريرية في مدينة الموصل

رؤى عامر ثامر صالح العبيدي

رسالة ماجستير

علوم الحياة / الاحياء المجهرية

باشراف

الاستاذ الدكتورة اميرة محمود محمد الراوي

1444هـ

2022م

الخلاصة

أولت الدراسة الحالية اهتماماً بالتحري عن جرثومة *Streptococcus pneumoniae* (*S.pneumoniae*) من عينات القشع التي شملت عينة من المرضى الوافدين والراقدين في المستشفيات (مستشفى السلام ومستشفى ابن سينا) المصابين بالتهابات الجهاز التنفسي السفلي وبشكل اكثر وضوحاً شملت الدراسة عزل جرثومة *S.pneumoniae* وتشخيصها باستخدام طرائق الزرع الروتينية واختبار حساسية الاوبتجين والفحص المجهري وتم تأكيد تشخيصها باستخدام تقنية الفايتيك2 إذ بلغت نسبة عزلات الجرثومة 10% (5عزلات). وتم عزل الجراثيم الاخرى وتشخيصها من عينات القشع حيث عزلت الجراثيم الموجبة لصبغة كرام *Staphylococcus aureus* و *Micrococcus luteus* و *Staphylococcus hominis* بنسب بلغت 40% و30% و2 % على التوالي ، في حين عزلت انواع سالبة لصبغة كرام التي شملت *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* وبنسبة 6% و2% على التوالي.

تناولت الدراسة أيضاً التحري عن انتاج الجرثومة للنيمولايسين بثلاث طرائق شملت طريقة اكار ثنائي الطبقة وطريقة الخط المتعامد، وطريقة الانتشار بحفر الاكار وبينت النتائج قابلية عزلات جرثومة *S.pneumoniae* على انتاج النيمولايسين إذ كانت طريقة الأكار ثنائي الطبقة الاكفأ من بين الطرائق المستخدمة .واختبرت قابلية النيمولايسين المنتج في تثبيط جرثومة *S.aureus* و *E.coli* فيما لم يبدِ فعالية في تثبيط جرثومة *P.mirabilis* .

وأثبتت النتائج قدرة الجرثومة على افراز الهيمولايسين مما ينتج عنه تحلل كامل النوع (بيتا) لكريات الدم الحمراء في وسط اكار الدم

تضمنت الدراسة في الجانب الجزيئي التحري عن جينات *ply* و *hlys* باستخدام تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي Polymerase Chain Reaction (PCR)، واظهرت النتائج ان عزلات جرثومة *S.pneumoniae* تحوي الجين *ply* بنسبة (60%) والجين *hlys* بنسبة (80%) . وأجري التحليل التتابعي لكلا الجنينين ، واظهرت نتائج التحليل التتابعي للنيوكليوتيدات وجود تباين بين العزلات على مستوى الجين للجنينين كليهما بظهور طفرات نقطية كما واظهرت العلاقة التطورية بين العزلات اعتماداً على الجين *ply* نسبة تطابق 99% في حين ابدت اعتماداً على الجين *hlys* نسبة تطابق 98% مقارنة مع العزلات العالمية المسجلة في موقع NCBI.

كما تناولت الدراسة في احد جوانبها التحري عن مقاومة جرثومة *S.pneumoniae* لبعض المضادات الحيوية إذ اظهرت العزلات الجرثومية مقاومة بشكل شديد للعلاج بالمضاد الحيوي AK (Amikacin) بنسبة 100% فيما اظهرت مقاومة اقل تجاه العلاج بالمضادات CIP (Ciprofloxacin) و CTX (Cefotaxime) وبنسبة 60%، واظهرت نسبة مقاومة 40% تجاه

المضـاد (Erythromycin) E نسـبة 20% تجـاه كـل مـن (DO Doxycyclin) و CAZ (Ceftazidime) و CRO (Ceftrixone) و (CN Gentamicin) و AK (Amikacin) و AZM (Azithromycin).

وتضمن المحور الأخير من الدراسة التحري عن قابلية بعض المستخلصات النباتية والأعشاب الطبية على تثبيط جرثومة *S.pneumoniae* إذ اظهر المستخلص الكحولي لبذور السفرجل فعالية تثبيطية ضد الجرثومة في حين لم يظهر مستخلص ثمرة السفرجل وأوراق الآس والقهوة الخضراء أي قابلية في تثبيط الجرثومة.

Abstract

The current study paid attention to investigation of *Streptococcus pneumoniae* from sputum specimens, which included 50 specimens of incoming and outgoing patients with respiratory infections in some hospitals of Mosul city . More clearly, the study included isolation and identification of *S.pneumoniae* using routine culture methods, optochin sensitivity and microscopy examination and their identification was confirmed using Vitek2 technique, where the percentage of bacteria isolates reached 10% (5 isolates). Also, other bacteria were isolated and identification from sputum specimens, where Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* and *Staphylococcus hominis* were isolated at rates of (40%),(30%)and(2%), respectively, while Gram-negative species were isolated, including *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, with percentages of(6%) and (2%).

The study also deals with the phenotypical investigation of the bacterial production of pneumolysin by three methods including the agar double layer method, the cross line method, and the agar pits diffusion method. The double-layer agar method was the most efficient among the methods used. The ability of the produced pneumolysin to inhibit types of Gram-positive and Gram-negative bacteria was tested, and it showed effectiveness in inhibiting *S.aureus* and *E.coli*, while it was not effective in inhibiting *P. mirabilis.* The study also focused on the investigation of hemolysin and the ability of bacterium to produce it.

On the molecular side, the study included the detection of the *ply* and *hlys* genes using the PCR Polymerase Chain Reaction technique. The results showed that the isolates of *S.pneumoniae* contain the *ply* gene (60%) and the *hlys* gene (80%). sequence analysis was conducted for both genes. The results of the nucleotide sequence analysis were variable between the isolates at the level of the gene and for both genes, as this was indicated by the appearance

of point mutations. The evolutionary relationship between the isolates depending on the *ply* gene showed a 99% match, while it showed a 98% match with the global isolates recorded on the NCBI.

The study also deals with an aspect of investigating the resistance of *S.pneumoniae* to some antibiotics, where isolate S1 showed strong resistance at 100%, isolate S2 at 75%, isolate S3 66.6%, and isolates S4 and S5 showed resistance at 58.3% to the antibiotics used in the study (CIP Ciprofloxacin), CTX (Cefotaxime) E (Erythromycin) DO (Doxycyclin) CAZ (Ceftazidime) CRO (Ceftrixone), CN (Gentamicin), AK (Amikacin), AZM (Azithromycin).

The last part of the study included investigating the ability of some plant extracts and medicinal herbs to inhibit the bacterium S.pneumoniae, where the alcoholic extract of quince seeds showed an inhibitory activity against the bacterium, while the extract of quince fruit, myrtle leaves and green coffee did not appear any inhibitory effect on bacterial growth.

University of Mosul

College of Sciences

Molecular Characterization of *ply* and *hlys* genes in *Streptococcus pneumoniae* Isolated from Clinical Specimens in Mosul City

Roaa Amer Thamer Saleh Al-Obady

M.Sc. Thesis

Biology /Microbiology

Supervised By

Prof. Dr. Amera Mahmood Mohammed Al-Rawi

1444 A.H. **2022 A.D.**