جامعة الموصل
كلية العلــوم

تحديد الفعالية التثبيطية لبعض المواد تجاه بكتريا *Acinetobacter baumannii* المعزولة من مصادر مختلفة والكشف عن جينات بعض عوامل ضراوتها

نور حسين أحمد محمد الجبوري

رسالة ماجستير
علوم الحياة / أحياء مجهرية

بإشراف
الدكتورة غادة عبد الرزاق محمد ابراهيم الطائي
أستاذ مساعد

١٤٤٠هـ
٢٠١٩م

الخلاصة

تم جمع 233 عينة من حالات مرضية (جروح، ادرار، إصابات الجهاز التنفسي، حروق، سائل النخاع الشوكي) ومن بيئات المستشفيات, للفترة ما بين شهر آب 2017 ولغاية شهر كانون الثاني 2018 من مستشفيات مدينة الموصل للتحري عن وجود بكتريا *Acinetobacter baumannii* .

زرعت العينات على الأوساط الزرعية الانتقائية للبكتريا وهي Leed Acinetobacter agar و Herellea agar فضلاً عن زرعها على وسط أكار الدم وأكار الماكونكي , ثم أجريت الاختبارات الكيموحيوية للبكتريا, وأكمل التشخيص باستخدام نظام API 20 E , وتم الاعتماد بشكل قطعي ونهائي على التشخيص الجزيئي للعزلات من خلال التحري عن وجود الجين التشخيصي $bla_{oxa\text{-}51\ like}$ باستخدام تقنية الـ PCR , تم الحصول على 19 عزلة لبكتريا *Acinetobacter baumannii* بنسبة (8.1 %) .

لغرض تحديد أي من عزلاتنا المحلية تعود لمجموعة MDR Multidrug resistant- *A.baumannii* أو XDR Extensive drug resistant, تم اجراء اختبار الحساسية ضد (15) نوعاً من المضادات الحيوية لجميع العزلات , وبينت النتائج المقاومة العالية لعزلات *A.baumannii* للمضادات الحيوية , إذ أظهرت جميع العزلات مقاومة بنسبة 100% لتسعة مضادات حيوية هي: Ceftriaxone و Meropenem و Azithromycin و Tobramycinو Amikacin و Gentamicin و Ciprofloxacin و Nalidaxic acid و Trimethoprime , وبهذا كانت نتائج دراستنا الحصول على نسبة 100% MDR-Ab , كما تم الحصول على 16 عزلة بنسبة (84.2%) تابعة لـ XDR-Ab.

تم التحري عن قابلية العزلات على الالتصاق على سطح طبق البوليستيرين وامتلاكها لانزيم الـ malonate succinate وعن قابليتها على تمييع الجيلاتين وكانت النتائج قدرة جميع العزلات على الالتصاق على البوليسترين , مع عدم امتلاكها لانزيم الجيلاتينيز, بينما أظهرت تبايناً في استهلاكها للمالونيت.

تم الكشف عن قابلية تكوين الغشاء الحيوي من قبل بكتريا *A.baumannii* وأظهرت جميع العزلات القدرة على تكوين هذا الغشاء بنسبة 100%. أنتخبت أربع عزلات من البكتيريا التي أظهرت أعلى نسبة تكوين للغشاء الحيوي فضلاً عن استخدام العزلة القياسية *A. baumannii* ATCC 19606 وتم التحري عن تثبيط الغشاء الحيوي فيها باستخدام مادة الـ EDTA وخمسة من الأحماض الأمينية وهي (الكلايسين , الفينايل النين , حامض الكلوتاميك , المثيونين , الليوسين) , وخمسة من المستخلصات النباتية وهي (الكركم, القرنفل, الغار, الآس

وأكليل الجبل), وبينت النتائج أن لمادة الـ EDTA تأثيراً تثبيطياً واضحاً عند التركيز 150ملغم/لتر، كما وكان لحامض الكلوتاميك بتركيز 50 ملي مولار فعالية تثبيطية للغشاء، في حين تباينت المستخلصات النباتية في تثبيطها , إذ أظهر مستخلص نبات الكركم تأثيراً تثبيطياً جيداً، فيما لم تظهر بقية المستخلصات النباتية أية فعالية تثبيطية ضد تكوين الغشاء الحيوي .

تم الكشف عن تواجد بعض من جينات الضرواة التي تضمنت ستة جينات (*fyu A* , *iut A* , *las B* , *csg A* ,*plc N* , *omp A*) باستخدام البادئات الخاصة لكل منها عن طريق تقنية PCR , وأظهرت النتائج تواجد هذه الجينات بنسبة 100% و52.6% و 63.1% و21% و21% لكل منهم على التوالي , بينما لم يتم العثور على الجين *fyu A* في اي من عزلات *A.baumannii* .

أجري التباين الوراثي لجميع عزلاتنا المحلية وبوجود العزلة القياسية معها باستخدام تقنية الـ RAPD واستخدام البادئ ERIC-2 , وتم الحصول على 12 نمطاً جينياً لها , توزعت في اربع مجاميع وثمان عزلات منفردة , بأوزان جزيئية تراوحت بين (251-1548) زوج قاعدي , وبرسم الشجرة التطورية تبين أن اثنتين من العزلات المأخوذة من بيئة المستشفى أظهرت تباعداً عن غيرها من بقية العزلات.

تم إجراء التحليل التتابعي Sequencing لثلاث من العزلات التي أظهرت تبايناً في النمط المظهري عن النمط الجيني وكانت النتائج تطابق عزلتين مع السلالة *Acinetobacter baumannii* MDR-ZJ06, complete genome وبنسبة 95% , بينما اظهرت العزلة الثالثة تطابقاً مع نفس السلالة ولكن بنسبة 96%.

University of Mosul
College of Sciences

Inhibitory Effect Determination of some Materials Against *Acinetobacter baumannii* Isolated from Various Sources and Detection Some Virulance Factor Genes

Noor Hussein Ahmad Al-Jubory

M.Sc Thesis

in

Biology / Microbiology

Supervised By

Dr. Ghada Abdul-Razzaq Mohammad Al-Taee

Assist. Prof

1440 A.H. **2019 A.D.**

ABSTRACT

A total of 233 samples of different clinical (wounds, urine, respiratory tract infections, burns, C.S.F.) and hospitals environment samples were collected between August 2017 and January 2018 from Mosul hospitals to investigate the presence of *Acinetobacter baumannii*.

Samples were cultivated on selective media : Leed Acinetobacter agar and Herellea agar, as well as, they cultured on the Blood agar and MacConkey Agar , then the biochemical tests of the bacteria were performed, the diagnosis was completed using the API 20E system, and the molecular diagnosis of our local isolates was finally and definitively determined by investigating the presence of the diagnostic gene ($bla_{oxa\text{-}51\ like}$)Using PCR technology. Nineteen isolates of *Acinetobacter baumannii* were obtained (8.1%).

For the purpose of identifying any of our local isolates belonging to the Multidrug resistant- *A.baumannii*(MDR) or Extensive drug resistant (XDR) group, sensitivity test was done against 15 antibiotics for all isolates. The results showed high resistance to *A.baumannii* isolates of antibiotics. All isolates showed 100% resistance to nine antibiotics: Ceftriaxone, Meropenem, Azithromycin, Tobramycin, Amikacin, Gentamicin, Ciprofloxacin, Nalidaxic acid and Trimethoprime. The results of this study were 100% MDR-Ab and 16 isolates (84.2%) of XDR-Ab.

The ability of isolates to adhere on the polystyrene and to possess the malonate succinate enzyme and its ability to liquefaction the gelatin was investigated. The results showed that all the isolates were able to adhere to the polystyrene, with no gelatinase enzyme, while showing a difference in their consumption of malonate.

Biofilm formation was investigated by *A.baumannii* and all isolates showed the ability to form the biofilm (100%). Four isolates were identified from the bacteria that showed the highest levels of biofilm formation as well as the use of standard strain *A. baumannii* ATCC 19606. Inhibition of the biofilm was investigated using EDTA and five amino acids(Glycine,Phenylalanine, Glutamic acid, Methionine, Leucine) and five of the plant extracts(Turmeric, Cloves, Bay leaf, Myrtle and Rosemary).The results showed that EDTA has a significant inhibitory effect in concentration of 150 mg/l. The50 mM concentration of Glutamic acid had inhibitory effect on the biofilm, while plant extracts were varied in their inhibition, turmeric showed a good inhibitory effect, while the other extracts showed no effective inhibition against biofilm formation.

The presence of some virulence genes that included six genes (*omp A, plc N, csg A, las B, iut A, fyu A*) were detected using their specific primers using PCR technique , results showed the presence of these genes as 100% and 52.6% and 63.1% and 21% and 21% respectively, while the gene *fyu A* was not found in any isolates *A.baumannii* .

The genetic variation of all local isolates and standard strain was carried out by RAPD technique using ERIC-2 primer, Twelve genotypes were obtained, divided into four groups and eight single isolates, with molecular weights ranging from 251- 1548 bp. The evolutionary tree showed that two of the isolates taken from the hospital environment showed away from other isolates.

Sequencing analysis was performed for three isolates showing a variation in the phenotypic pattern of the genotype. The results matched two isolates with the *Acinetobacter baumannii* MDR-ZJ06, complete genome by 95%, while the third isolates showed the same strain but by 96%.