جامعة الموصل

كلية التربية للعلوم الصرفة

دراسة جزيئية للأغشية الحيوية المنتجة من البكتريا العنقودية الذهبية

ناديه قحطان محمود عباس الشريفي

اطروحة دكتوراه

علوم الحياة

باشراف

الاستاذ المساعد

الدكتورة نجوى ابراهيم خليل

الاستاذ المساعد

الدكتورة غادة يونس عبد الرحمن

١٤٤٤هـ

٢٠٢٢ م

الخلاصة:

جمعت (200) عينة (100) مسحة من الانف و (100) مسحة من اليدين للعاملين في مجال طب الاسنان (96 اطباء الاسنان و 4 مساعدين) من كلا الجنسين (61 ذكور و39 اناث) وتراوحت اعمارهم بين(17- 50 سنة) في المستشفى التعليمي لكلية طب الاسنان- جامعة الموصل وللفترة من 17 كانون الاول2020 الى 9 شباط 2021.

تم تشخيص العزلات بالاعتماد على الصفات المزرعية والفحص المجهري و الاختبارات الكيموحيوية واستخدام جهاز الفايتك Vitek 2 compact لتأكيد نوع العزلة ، حيث اظهرت 66 عزلة(36.85%) ; 32 (37.2%) من اليدين و34 (36.5%) من الانف، قابليتها على تخمر سكر المانيتول، وكانت جميع عزلات المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* موجبة لاختبار الكتاليز Catalase test وبنسبة 100%، بينما كانت 17 (53.125%) من اليدين و25 (73.52 %) من الانف موجبة لاختبار انزيم التخثر Coagulase test ، كما تم تشخيص 36 عزلة مخمرة لسكر المانيتول بجهاز الفايتك والتي كانت موزعة على الشكل الأتي : 20 (55.55%) عزلة من جرثومة *S.aureus* ;14 عزلة (63.63%) من الانف و 6 عزلات (42.85%) من اليدين، 5 (13.88%) عزلات من جرثومة *S.lugdunensis* ;4 (18.8%) عزلات من الانف وعزلة واحدة (7.14%) من اليدين، 4 (11.11%) عزلات من جرثومة *S. saprophyticus*; عزلتين (9.09%) من الانف وعزلتين(14.28%) من اليدين ، وعزلتين(5.55%) من جرثومة *S.hominis* من اليدين فقط (14.28%)، و 3 (8.33%) عزلات من جرثومة *S.warneri* ;عزلتين (9.09%) من الانف وعزلة واحدة(7.14 %) ، من اليدين واخيراً عزلة واحدة (2.77%) من كل من جرثومتي *S.sciuri* و *Leuconostoc mesenteroides* ومن اليدين وبنسبة (7.14%).

تم تحديد حساسية عزلات المكورات العنقودية المختلفة لمضاد Oxacillin باستخدام التركيز المثبط الادنى (MIC) وباستخدام جهاز الفايتك وذلك لكون مضاد الاوكساسلين يماثل المثيسلين بالجهاز، وتبين اختلاف العزلات في مقاومتها لهذا المضاد الحيوي اذ كانت اعلى نسبة للمقاومة (100%) لكل من *S.lugdunensis* و *S.sciuri*، اما *S.aureus* فقد بلغت نسبة مقاومتها 80 % ثم *S.warneri* ، *S.hominis* ، *S.saprophyticus* 66.67% و 50% و 25% على التوالي . من ناحية اخرى تم تحديد حساسية عزلات المكورات العنقودية للمضادات الحيوية بحسب طريقة Kirby-Bauer وباستخدام سبعة انواع من المضادات الحيوية PenicillinG، Methicillin، Oxacillin، Ciprofloxacin، Rifampicin، Vancomycin ، Erythromycin اذ اظهرت جميع عزلات *Staphylococcus* مقاومتها

للاوكساسلين والمثيسلين وبنسبة 100% ماعدا عزلات *S.saprophyticus* فكانت نسبة المقاومة 50% للاوكساسلين .

اختيرت ست عزلات من *S. aureus* لدراسة قدرتها على تكوين الاغشية الحيوية بطريقة اطباق المعايرة الدقيقة Microtiter plate مدعومة بالدراسة الجزيئية وباستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR ، واظهرت النتائج ان العزلات الستة من *Staphylococcus aureus* لها القابلية على تكوين الاغشية الحيوية لانها تمتلك الجينات *ica*A وبحجم 188 bp و*ica*D وبحجم 198bp وبنسب مئوية بلغت (83.3 و 100%) على التوالي، كما تبين ان (83.3%) من هذه العزلات كانت تحتوي جينات *ica*A و *ica*D ، ماعدا عزلة واحدة امتلكت الجين *ica*D فقط وبنسبة (16.6%) ولذلك كونت غشاءً حيوياً بدرجة اقل من بقية العزلات، واظهرت النتائج ايضا ان 50% من عزلات جرثومة *S.aureus* كانت مقاومة للمثيسلين وذلك بسبب إمتلاكها للجين *mec*A وبحجم 125bp المشفر لصفة المقاومة لهذا المضاد الحيوي.

وعند التحري عن جينات المقاومة للمضادات الحيوية والمطهرات تبين ان جميع العزلات الستة لم تكن تحتوي على الجين *qac*A\ B وبحجم 1125bp ، بينما كانت مالكة للجين *smr* وبحجم 286bp بنسبة مئوية بلغت (16.6%)، تم اجراء اختبار الاقتران باستخدام عزلتين من جرثومة *S.aureus* والمختلفتين بالعلائم الوراثية وهي صفات المقاومة للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة وتكوين الاغشية الحيوية وكانت العزلة الواهبة مقاومة للمضاد الحيوي Vancomycin وحساسة للمضاد الحيوي Rifampcin ومقاومة للمعادن الثقيلة وهي كلوريد الزئبق وكلوريد الكادميوم و كلوريد النيكل وكلوريد النحاس ومكونة للاغشية الحيوية اما العزلة المستلمة فكانت مقاومة للمضاد الحيوي Rifampcin وحساسة للمضاد الحيوي Vancomycin وحساسة لكلوريد الزئبق ومقاومة لكلوريد الكادميوم ، كلوريد النيكل وكلوريد النحاس وغير مكونة للاغشية الحيوية وعليه تم اختيار المضادين الحيويين Vancomycin و Rifampcin والمعدن الثقيل كلوريد الزئبق لاختبار العزلات الناتجة عن الاقتران، واظهرت هذه العزلة الجرثومية مقاومة للمضادين الحيويين Vancomycin و Rifampcin ومقاومة لكلوريد الزئبق واظهرت قابليتها على تكوين الاغشية الحيوية باستخدام طريقة اطباق المعايرة الدقيقة وبلغ تردد الاقتران 21×10^{-4} وحدة ، وعند التحري الجزيئي عن الجينات المسؤولة عن تكوين الاغشية الحيوية وهي *ica*A و *ica*D فكانت النتائج كالاتي : العزلة الواهبة والمستلمة تمتلك كل من الجينين *ica*A و *ica*D معا اما بالنسبة للعزلة الناتجة من الاقتران فتمتلك لجين واحد فقط *ica*D وعند قياس التعبير الجيني بتقنية qRT-PCR لجيني *ica*A و *ica*D المسؤولان عن تكوين البروتينات اللاصقة في الاغشية الحيوية في العزلات المدروسة الواهبة ، المستلمة

والناتجة من الاقتران اظهرت العزلة الناتجة من الاقتران اعلى قيمة في التعبير الجيني لهذين الجينين اذ بلغت 2.143547 و2.297397 على التوالي من العزلة الواهبة اذ بلغ تعبيرها الجيني (1و1) لكلا الجينين اما العزلة المستلمة فبلغ تعبيرها الجيني 1.414214 و 0.933033 على التوالي ، تم اختيار مادة العكبر Propolis لتحضير المستخلص الكحولي ودراسة فعالية المضادة لعزلات جرثومة *S.aureus* حيث كانت جميع العزلات المستخدمة حساسة له عند التركيز 10/1 مقارنة بالفانكومايسين المستخدم كمقارنة سالبة اذ بلغت نسبة التأثير 0.32288 اما بالنسبة للتراكيز الاخرى المستخدمة في الدراسة وهي 1/1 و 100/1 فكانت العزلات الجرثومية مقاومة لها وبلغت مقاومتها 0.86475 و 0.80613 على التوالي مقارنة مع القيمة المعنوية المستخدمة .

Abstract

200 samples were collected , 100 swabs from the nose and 100 swabs from the hands, of dental workers (96 dentists and 4 assistants) of both sexes ,61 males and 39 females , their ages ranged from 17 to 50 years in the teaching hospital of the Collage of Dentistry, University of Mosul from the period 17th Dec. 2020 to 9th Feb.2021.

The isolates were diagnosed based on culture traits, microscopic examination, biochemical tests, and the use of the Vitek – 2compact device to confirm the the type of isolate 66 isolates (36.85%) ;32(37.2%) of the hands and 34 (36.5%) of the nose were capable of fermenting mannitol sugar, and all *Staphylococcus aureus* isolates were positive for catalase test at 100%, while 17(53.125%) of the isolates from the hands and 25 (73.52%) of the nasal isolates were positive for the coagulase test. Using the Vitek 2-compact 36 fermented isolates were diagnosed which were distribute as follows 20 (55.55%) isolates of *S.aureus* bacteria; 14 isolates (63.63%) from the nose and 6 isolates (42.85%) from hands, 5 (13.88%) isolates of *S.lugdunensis*;4 isolates (18.18%) from the nose and one isolate (7.14%) from the hands, 4 (11.11%) isolates of *S. saprophyticus* bacteria; two isolate (9.09%) from the nose and two isolate (14.28%) from the hands, 2 (5.55%) isolates of *S.hominis* (14.28%%) from hands only and 3 (8.33%) isolates of *S.warneri;* two isolates from the nose (9.09%) and one isolate (7.14%) from the hands, and finally one (2.77%) isolate from each of *S.sciuri* and *Leuconostoc mesenteroides* bacteria and from hands with percentage (7.14%).

The sensitivity of the different Staphylococcus isolates to oxacillin was determined using minimum inhibitory concentration (MIC) and using the Vitek device because the antibiotic oxacillin is similar to methicillin

in the device, and it was found that the isolates differed in their resistance to this antibiotic, were the highest resistance (100%) was for *S.lugdunensis* and *S.sciuri* while for *S.aureus* its resistance was 80% then *S.warneri S.hominis*, *S. saprophyticus* 66.67%, 50%, 25% respectively. On the other hand, the sensitivity of different isolates to antibiotics was determined according to Kirby – Bauer method. And by using seven types of antibiotics Penicillin G, Methicillin,Oxacillin, Ciprofloxacin, Rifampicin, Vancomycin, Erythromycin where all Staphylococcus isolates showed resistance to Oxacillin and Methicillin at percentage 100% except for isolates *S. saprophyticus,* the resistance was 50% for oxacillin.

Six isolates of *S.aureus* were selected to study their ability to form biofilms by microtiter plate method supported by molecular study and using PCR technique, the results showed that the six isolates of *Staphylococcus aureus* have the ability to form biofilms because they have genes *ica*A and size 188 bp and *ica*D and size198 bp with percentage of (83.3 and 100%) respectively, and it was found that (83.3%) of these isolates contained the *ica*A and *ica*D genes except for one isolate that possessed the *ica*D gene only at rate of (16.6%) therefore formed a biofilm to a lesser degree than the rest of the isolates, the results showed that (50%) isolates of *S.aureus* bacteria were resistant to methicillin due to their possession *mec*A gene and size 125 bp that encodes resistance to this antibiotic,When investigating genes that are resistant to antibiotics and antiseptics, it was found that all six isolates did not contain the gene *qac*A\ B and size 1125 bp while they possessed the *smr* gene and size 286 bp with a percentage of (16.6%) and Conjugation test was carried out using two isolates of *S.aureus* with different genetic markers, which it is the characteristics of resistance to antibiotics, heavy metals and formation of biofilms, the donor isolate was resistant to antibiotics Vancomycin, sensitive to antibiotics Rifampcin and resistant to heavy metals, mercury chloride, cadmium chloride, nickel chloride and

copper chloride and composed of biofilm, As for the received isolate it was resistant to antibiotics Vancomycin sensitive to antibiotics Rifampcin, sensitive to mercury chloride resistant to cadmium chloride, nickel chloride and copper chloride and not forming biofilms,therefore antibiotics Vancomycin and Rifampcin and heavy metal mercury chloride were selected to test isolates resulting from conjugation this bacterial isolate showed resistance to mercury chloride and showed its ability to form biofilms using micro titer plates method. The coupling frequency was 21×10^{-4}.Upon molecular investigation of the genes responsible for the formation of biofilms which are *ica*A and *ica*D, the results were that the donor and recipient isolate possess both genes *ica*A and *ica*D together, As for the isolate resulting from conjugation, it possesses only one *ica*A gene.And when the gene expression was measured using qRT-PCR technique for the two genes *ica*A and *ica*D responsible for the formation of adhesive proteins in the biological membranes in the studied donor, recipient and resulting from conjugation, The isolation resulting from conjugation showed the highest value in gene expression for these two genes as it reached 2.143547 and 2.297397 respectively, from donor isolate as it is genetic expression reached (1and1) for both genes as for the receiving isolate, it is gene expression was reported 1.414214 and 0.933033 respectively. Propolis was selected for the preparation of the alcoholic extract and the study of the antibacterial activity of the *S.aureus* isolates, as all the isolates used were sensitive to it at a concentration of 1\10 compared to Vancomycin used as a negative comparison as the effect ratio was 0.32288.As for the other concentration used in this study which are 1\1 and 1\100, the bacterial isolates were resistance to it, as their resistance 0.86475 and 0.80613 respectively compared with the significant value used.

University of Mosul

College of Education

for Pure Science

Molecular study of biofilms produced by *Staphylococcus aureus*

Nadia Qahtan Mahmood Abbas AL-shorify

Ph.D. Thesis

Biology

Supervised by

Assist. Prof.

Dr.Najwa Ibrahim Khaleel

Assist. Prof.

Dr.Ghada Younis Abdulrahman

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