جامعة الموصل

كلية العلوم

تشخيص وتثبيط السم المعوي A لبكتريا العنقوديات الذهبية باستخدام طرق مظهرية وجزيئية

بشرى علي كاظم حاتم

أطروحة دكتوراه

علوم الحياة / الأحياء المجهرية

باشراف

الأستاذ الدكتور

محسن أيوب عيسى

الأستاذ المساعد الدكتور

مجيد أرشيد سباح

1443هـ

2022م

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة بهدف التحري عن إمكانية تثبيط إنتاج السموم المعوية في بكتريا *Staphylococcus aureus* على المستويين المظهري والجزيئي بإستخدام المستخلصات النباتية الخام بنوعيها المائية والكحولية لكل من بذور العنب والزنجبيل والقرفة والنعناع فضلاً عن إستخدام كل من مضاد Ceftriaxone وحامض التانك، وجمعت لهذا الغرض 320 عينة من مصادر بيئية ومرضية مختلفة في مدينة الموصل وبغداد للمدة من كانون الثاني 2020م لغاية أيلول 2020م، أظهرت نتائج العزل والتشخيص التي إستخدمت فيها طرق التشخيص المختلفة والتي شملت الطرائق المظهرية (الزرعية والمجهرية والكيموحيوية) فضلاً عن تأكيد التشخيص باستخدام نظامي APISTAPH وVitek 2 أن بكتريا *Staph.aureus* عزلت بنسبة 25.63% من مجموع العينات الكلي حيث تم الحصول على 82 عزلة تابعة لهذه البكتريا وتوزعت على جميع مصادر العزل المدروسة بنسب متباينة بلغت 30 % من المصدر المرضي و 40 % و23.6 % و 25% و 6 % من مصدر ماء الحنفية والغذاء والنبيت الطبيعي والتربة على التوالي ، في حين عزلت من بيئة المستشفيات بنسبة 20% حسب مجموع عينات كل مصدر عزل ، مما يعكس تواجد هذه البكتريا في جميع البيئات المدروسة وإنتشارها.

أظهرت نتائج التحري المظهري عن إنتاج السموم المعوية بإستخدام الطريقة الزرعية أن 70.73% من عزلات *Staph.aureus* منتجة لهذه السموم ، كما أظهرت نتائج هذه الطريقة في الوسط السائل أن تركيز السموم المعوية المنتجة كانت مختلفة تراوحت من 0.134 إلى 2.1 بدلالة الكثافة الضوئية وكانت نسبة العزلات ذات الإنتاجية العالية 39.66% بهذه الطريقة ، فيما كانت نسبة عزلات *Staph.aureus* المنتجة للسموم المعوية بهذه الطريقة وتبعاً لمصدر العزل هي 58.3% من المصدر المرضي ، ومن ماء الحنفية 70% ، الغذاء 100% ، النبيت الطبيعي 80% واخيراً من التربة وبيئة المستشفيات بنسبة 100% و60% على التوالي ، وبينت نتائج دراسة منحني النمو وتحديد وقت إنتاج السموم المعوية أن الإنتاج يبدأ بعد 6 ساعات من التحضين ويزداد زيادة اسية ليصل إلى اقصاه بعد 18 ساعة وبأعلى تركيز 0.54 مايكروغرام / مل بطريقة برادفورد.

أما بالنسبة للتحري المظهري عن إنتاج السم المعوي A بالطريقة المناعية باستخدام فحص الإليزا فقد اظهرت النتائج أن 57.32% من هذه العزلات منتجة له وتراوحت التراكيز ما بين 3.74 إلى 15.7 نانوغرام/ مل حيث كانت نسبة العزلات ذات الإنتاجية العالية من هذا السم 46.81% ، وكانت نسبة إنتاج السم A ضمن عزلات المصدر المرضي 41.7% ومن مصدر الغذاء 92.31% ومن ماء الحنفية 55% ومن النبيت الطبيعي 80% ومصدر التربة 66.7% وأخيراً من بيئة المستشفيات بنسبة 60% .

أوضحت نتائج التشخيص الجزيئي للجين *sea* المشفر للسم المعوي A أن حزمته ذات حجم 500 زوج قاعدة ، كما أظهرت نتائج دراسة التتابع الجيني لهذا الجين اكتشاف خمسة تغايرات جينية جديدة له

في بكتريا *Staph.aureus* ، وهذه التغايرات توزعت في مصادر عزل مختلفة ، مما يعكس اختلافات في التتابع الجيني للسم المعوي A تبعاً لتباين المصدر والموقع الجغرافي للعزل.

بالنسبة لمحور دراسة تثبيط إنتاج السموم المعوية أظهرت نتائج التحري الأولي عن المركبات الفعالة في المستخلصات النباتية الثمانية المحضرة أنها تحتوي على مواد فعالة مثل الفلافونويدات والقلويدات والتانينات والزيوت الطيارة والكلايكوسيدات وغيرها ، كما بينت نتائج الكشف عن المجاميع الفعالة في المستخلصات المحضرة بتقنية FTIR أنها تحوي مجاميع فعالة مختلفة تباينت حسب نوع النبات ونوع المستخلص ، وحددت قيم MIC و SMIC لهذه المستخلصات ولحامض التانك ومضاد Ceftriaxone بطريقة التخفيف الدقيق وقد أظهرت النتائج أن كلاً من MIC و SMIC لكل من حامض التانك ومضاد Ceftriaxone والمستخلص الكحولي للقرفة كانت 8 و 4 مايكروغرام / مل على التوالي فيما كانت هذه القيم لكل من المستخلصين المائي والكحولي للنعناع والمستخلص المائي لبذور العنب والزنجبيل 32 و 16 مايكروغرام / مل على التوالي ، في حين أنها كانت لكل من المستخلص الكحولي لبذور العنب والزنجبيل والمستخلص المائي للقرفة 16 و 8 مايكروغرام / مل على التوالي .

أشارت نتائج التحري عن إمكانية تثبيط السموم المعوية في بكتريا *Staph.aureus* على المستوى المظهري أن كلاً من المستخلصين المائي والكحولي لبذور العنب والمستخلص الكحولي للنعناع أسهمت في تثبيط إنتاج السموم المعوية في عزلات هذه البكتريا وبنسبة 100%، فيما نجد أن كلاً من المستخلص الكحولي للزنجبيل والمستخلصين الكحولي والمائي للقرفة أدى إلى تثبيط إنتاج السموم المعوية في عزلات بكتريا *Staph.aureus* بنسبة 94.8% (عزلات التربة لم تتأثر) ولم يتأثر التثبيط المظهري لهذه السموم لجميع العزلات من المصادر المختلفة بالمستخلص المائي لكل من الزنجبيل والنعناع فضلاً عن حامض التانك ومضاد Ceftriaxone.

إستخدم تفاعل البلمرة الكمي اللحظي على المستوى الجزيئي لغرض قياس تثبيط التعبير الجيني للجين *sea* في عزلات *Staph.aureus* وبينت النتائج قدرة كل من المستخلص المائي والكحولي لبذور العنب والقرفة والمستخلص الكحولي للنعناع والزنجبيل على تثبيط التعبير الجيني لهذا الجين ، في حين حفز المضاد الحيوي Ceftriaxone التشفير العالي لهذا السم المعوي في بكتريا *Staph.aureus* المعزولة من مصادر مختلفة ، ولم يؤثر حامض التانك على هذا التعبير الجيني ، كما لم يتأثر تشفير السموم المعوية لعزلات التربة بعد معاملتها بكل من المستخلص الكحولي للزنجبيل والمستخلصين الكحولي والمائي للقرفة وجميع هذه النتائج مطابقة لما تم الحصول عليه في التثبيط على المستوى المظهري.

Abstract

This study was conducted with the aim of investigating the possibility of inhibiting the production of enterotoxins in *Staphylococcus aureus* at the phenotypic and molecular levels using of aqueous and alcoholic crude plant extracts of grape seed, ginger, cinnamon and peppermint, in addition to Ceftriaxone and tannic acid, for this purpose 320 samples had collected from different environmental and pathogenic sources in the city of Mosul and Baghdad for the period from January 2020 to September 2020. The results of isolation and diagnosis, in which various diagnostic methods were used, which included phenotypic methods (cultural, microscopic and biochemical) as well as confirmation of the diagnosis by using APISTAPH and Vitek 2 systems, showed that *Staph.aureus* were isolated with percentage 25.63% of the total samples where 82 isolates were obtained belonging to this bacteria , and they were distributed among all studied isolation sources with varying percentages amounting to 30% from the pathogenic source, 40%, 23.6%, 25% and 6% from the tap water source, food, normal flora and soil respectively,while from hospitals environment was isolated with the percentage 20% according to the total number of samples for each isolation source, which reflects the presence and spread of these bacteria in all studied environments.

The results of the phenotypic investigation of the production of enterotoxins using the culture method, showed that 70.73% of the *Staph.aureus* isolates produced these toxins. The results of this method in the liquid medium also showed that the concentrations of the produced enterotoxins were different, ranging from 0.134 to 2.1 with indicator of optical density,and the percentage of high producing enterotoxins was 39.66% by this method , and the percentage of isolates of *Staph.aureus* that produces enterotoxins in this method and according to the source of isolation were 58.3% from the pathogenic source, 70% of tap water, 100% of food, 80% of the normal flora , and finally 100% and 60% of the soil and hospitals environment respectively. The results of the study of the growth curve and determining the time of enterotoxins production showed that

production starts after 6 hours of incubation and increases exponentially to reach a maximum after 18 hours and with the highest concentration of 0.54 μg/ml by Bradford method .

As for the phenotypic investigation of the production of enterotoxin A by the immunological method using the ELISA kit as a representative of other enterotoxins, the results showed that 57.32% of these isolates produced it, and the concentrations ranged between 3.74 to 15.7 ng/ml and the percentage of high producing this enterotoxin was 46.81%, and the production rate of toxin A was within the isolates of the pathogenic source was 41.7% while from the food source was 92.31%, from the tap water 55%, from the normal flora 80%, and from the soil source 66.7% and finally from hospitals environment was 60% .

The results of the molecular diagnosis of the *sea* gene encoding enterotoxin A showed that its band has a size of 500 base pairs, and the results of the genetic sequence study of this gene showed the discovery of five new variants for it in *Staph.aureus*, and these patterns were distributed in different isolation sources, reflecting differences in the sequence of enterotoxin A genotype according to variation of the source and geographic location of the isolation.

As for the axis of the study of enterotoxins inhibition, the results of the preliminary investigation of the active compounds in the prepared plant extracts showed that they contain active substances such as flavonoids, alkaloides, tannins, volatile oils, glycosides, etc., and the results of the detection of the active groups in the prepared extracts using FTIR technique showed that they contain different active groups that varied according to the type of the plant and extract type, and the MIC and SMIC values for these extracts and for tannic acid and antibiotic Ceftriaxone were determined by microdilution test and the results showed that the MIC and SMIC for tannic acid, ceftriaxone and alcoholic extract for cinnamon were 8 and 4 μg/ml respectively while values of MIC and SMIC for aqueous and alcoholic extracts of peppermint as well as for aqueous

extract of grape seeds and ginger were 32 and 16 μg/ml respectively, while the values for alcoholic extract of grap seeds and ginger and aqueous extract for cinnamon were 16 and 8 μg/ml respectively.

The results of the investigation on the possibility of inhibiting enterotoxins in *Staph.aureus* bacteria at the phenotypic level indicated that both the aqueous and alcoholic extract of grape seed and the alcoholic extract of peppermint led to the inhibition of the production of enterotoxins in isolates of these bacteria by 100%, while we found that the alcoholic extract of ginger and the two extracts alcohol and aqueous of cinnamon inhibited the production of enterotoxins in *Staph.aureus* isolates by 94.8% (soil isolates had not affected). The phenotypic inhibition of these toxins in all isolates from different sources had not affected by aqueous extract of each peppermint and ginger as well as tannic acid and Ceftriaxone.

At the molecular level, quantitative real time polymerase chain reaction was used to measure the inhibition of gene expression of the *sea* gene in *Staph.aureus* isolates, the results showed the ability of aqueous and alcoholic extract of grape seed and cinnamon and alcoholic extract of peppermint and ginger to inhibit gene expression of this gene, while ceftriaxone stimulated the expression of this gene in *Staph.aureus* isolated from different sources at high level while tannic acid did not affect this gene expression, and the expression of these enterotoxins in soil isolates were not affected after treated with alcoholic extract of ginger and the aqueous and alcoholic extracts of cinnamon , all these results were identical to what obtained in inhibition at phenotypic level.

University of Mosul
College of Science

Identification and Inhibition of *Staphylococcus aureus* Enterotoxin A Using Morphological and Molecular Methods

Bushra Ali Kadhim Hattam

Ph.D. Thesis
Biology/ Microbiology

Supervised by

Prof.	Assist. Prof.
Dr. Muhsin Ayoub Essa	Dr. Majeed Arsheed Sabbah

1443 A.H **2022 A.D**