Ministry of Higher Education
and Scientific Research
Mosul University/ Science College
Biology Department

Molecular Identification of Biofilm-Forming Bacteria Isolated from Osteomyelitis and Study Some Biochemical and Histological Parameters of Samples

Tamara Ziyad Tariq Saeed Al-feel

M.Sc. thesis

In

Biology/Microbiology

Supervised By

Asst. Porf. Dr. Saba Abdul Salam Hamid Al-Sultan

Asst. Porf. Dr. Aws Ibrahim Sulaiman Nadir

1446 A.H **2024 A.D**

Abstract

Sixty Osteomyelitis samples have been collected, from January 10, 2024, to May 1, 2024, in Mosul, Iraq, out of which 54 have been confirmed as bacterial infection osteomyelitis cases. The age group of the collected patients is between (7- 70) years old, among whom 11(18.34%) were Females and 49(81.66%) were Males. Three types of culture media were used for primary isolation (nutrient agar, MacConkey agar, and blood agar) and diagnosed using the Vitek 2 compact technology *Staphylococcus aureus* 22 isolates (32.8%); *Pseudomonas aeruginosa* 12 isolates (17.9%); *Enterobacter* cloacae 5 isolates (7.5%) *Klebsiella pneumoniae* 4 isolates (5.9%); *Escherichia coli* 4 isolates (5.9%); *Proteus mirabilis* 3 isolates (4.5%); *Streptococcus viridans* 3 isolates (4.5%); *Corynebacterium* spp 2 isolates (3%).

The diagnosis was confirmed by molecular diagnosis by sequencing the 16S rRNA gene for seven isolates, and 6 isolates were registered with the National Center for Biotechnology Information (NCBI) because the percentage identity was between (99.83% - 100%) with the following names: *Morganella morganii* PP508217.1 (AST1) ; two isolates of *Corynebacterium striatum* PP508222.1 (AST2) and PP508248.1 (AST7); *Pseudomonas aeruginosa* PP508238.1 (AST3) ; *Escherichia coli* PP508239.1 (AST4) ; *Staphylococcus aureus* PP508249.1 (AST6).

As for the infection areas, the areas most exposed to bacterial infection were tibia, followed by femur, then foot 20 (37.03%), 17 (31.47%) and 9(16.70%) respectively. As for the other infection areas (radius, ankle, humerus, ulna, wrist, calcaneum), It gave results for the infection rate between 2 (3.70%) and 1 (1.85%).

The ability of the isolates to form biofilms was evaluated in several ways. The first method on medium Congo Red Agar and the second by Microtiter Plate Method. The results showed that all isolates showed the ability to form biofilms, on Congo Red Agar (62.5% strong, 25% moderate, and 12.5% mild)

and by the Microtiter Plate Method (50% strong, 50% moderate,). The aggregation of bacteria forming biofilms was confirmed by staining the bacterial swabs with differential gram stain, and different forms of the aggregation appeared depending on the types of bacteria.

The results of this study showed that the most influential risk factors are gender, area of injury, type of injury, and high temperature. The most affected Biomarkers are CRP and platelets count.

The results of this study showed that Gram-positive bacteria are more resistant to antibiotics than Gram-negative bacteria, and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* was one of the most antibiotic-resistant bacterial isolated from Osteomyelitis cases.

The activity of carvacrol extract was checked on both Gram-positive as well as on Gram-negative bacteria. It was found to be effective in both cases. Linezolid presents 100% efficacy on Gram-positive but did not prove any effectiveness on Gram-negative bacteria. The co-administration of linezolid with carvacrol extract has been proven to be effective on Gram-positive as well as Gram-negative bacteria.

We were molecular investigated the correlation between antibiotic resistance and the ability to form biofilms of bacteria, used two bacteria *S. aureus* as an example of Gram-positive bacteria (*icaC*) and *E. coli* as an example of Gram-negative (*FimH*).

We were detection the Azithromycin resistance genes in *S. aureus* and *E. coli* the results showed that there was a 100% correlation between the types of genes in both types of bacteria.

Histopathological examinations of bone tissue biopsies and soft tissue biopsies of the surrounding areas revealed that there are a number of histological changes including a response to inflammatory conditions, represented by an increase in acute and chronic inflammatory cells, as well as the appearance of Necrotic of Osteoid matrix heavy mixed chronic inflammatory cells.

الخلاصة

تم جمع ستين عينة من التهاب العظم والنقي، في الفترة من 10 يناير 2024 الى 1مايو 2024 في الموصل ،العراق ،منها 54 تم التاكد من انها حالات التهاب العظم والنقي بعدوى بكتيرية. تتراوح أعمار المرضى الذين تم جمعهم بين (7–70)عامًا، منهم 11 (18.34%) إناث و49 (81.66%) ذكور. تم استخدام ثلاثة أنواع من الاوساط الزرعية للعزل الأولي (Nutrient agar، MacConkey agar، وBlood agar).وتم تشخيصها باستخدام تقنية Vitek 2, إذ حصلنا على 22 عزلة (32.8%) من *Staphylococcus aureus*، 12 عزلة (17.9%) من *Pseudomonas aeruginosa*، 5 عزلات (7.5%) من *Enterobacter cloacae*، 4 عزلات (5.9%) من *Klebsiella pneumoniae*، 4 عزلات (5.9%) من *Escherichia coli*، 3 عزلات (4.5%) من *Proteus mirabilis*، 3 عزلات (4.5%) من *Streptococcus viridans*، 2 عزلة (3%) من *Corynebacterium spp*.

تم تأكيد التشخيص بواسطة التشخيص الجزيئي بتسلسل جين 16s rRNA لسبع عزلات، وتم تسجيل 6 عزلات في المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (NCBI) بالأسماء التالية: *Morganella morganii* PP508217.1 (AST1)، عزلتين من *Corynebacterium striatum* PP508222.1 (AST2) و(AST7) PP508248.1، *Pseudomonas aeruginosa* PP508238.1 (AST3)، *Escherichia coli* PP508239.1 (AST4)، *Staphylococcus aureus* (AST6) PP508249.1.

أما بالنسبة لمناطق الإصابة فان اكثر المناطق تعرضًا للاصابة البكتيرية هي عظم الساق، يليها عظم الفخذ، ثم القدم بنسبة 20 (37.03%)، 17 (31.47%) و9 (16.70%) على التوالي. أما

مناطق الإصابة الأخرى (الكعبرة، الكاحل، العضد، الزند، الرسغ، العقب)، فقد اعطت نتائج لنسبة الاصابة بين 2(3.70%) و 1(1.85%).

تم تقييم قدرة العزلات على تكوين الأغشية الحيوية بعدة طرق ، الطريقة الأولى على وسط Congo Red Agar والثانية بواسطة Microtiter Plate Method. أظهرت النتائج أن جميع العزلات أظهرت القدرة على تكوين الأغشية الحيوية، ولكن بقوى مختلفة، مصنفة كالتالي (قوي، متوسط، وخفيف). كانت النسب لوسط Congo Red Agar (62.5% قوي، 25% متوسط، و12.5% خفيف) وبطريقة Microtiter Plate Method (50% قوي، 50% متوسط،). تم تأكيد تجمع البكتيريا المكونة للأغشية الحيوية بصبغ المسحات البكتيرية بصبغة الجرام التفاضلية، وظهرت أشكال مختلفة من التجمعات بناءً على أنواع البكتيريا.

أظهرت نتائج هذه الدراسة أن عوامل الخطر الأكثر تأثيرًا هي الجنس، منطقة الإصابة، نوع الإصابة، ودرجة الحرارة العالية. أما بالنسبة للمؤشرات الحيوية الأكثر تأثرًا فهي C-reactive protein وعدد الصفائح الدموية.

أظهرت نتائج هذه الدراسة أن البكتيريا موجبة الجرام أكثر مقاومة للمضادات الحيوية من البكتيريا سالبة الجرام، وكانت *Staphylococcus aureus* المقاومة للميثيسيلين واحدة من أكثر العزلات البكتيرية المقاومة للمضادات الحيوية المعزولة من حالات التهاب العظم والنقي.

تم فحص نشاط مستخلص الكرفاكرول على البكتيريا موجبة الجرام وكذلك على البكتيريا سالبة الجرام. وُجد أنه فعال في كلا الحالتين. أما linezolid أظهر فعالية بنسبة 100% على البكتيريا موجبة الجرام ولكنه لم يظهر أي فعالية على البكتيريا سالبة الجرام. لقد ثبت أن الاستخدام المتزامن للينزوليد مع مستخلص الكرفاكرول فعال على البكتيريا موجبة الجرام وكذلك سالبة الجرام.

تم دراسة العلاقة الجزيئية بين مقاومة المضادات الحيوية والقدرة على تكوين الاغشية الحيوية للبكتيريا ، تم اختيار بكتيريا *S. aureus* كمثال على البكتيريا موجبة الجرام(icaC) وبكتيريا *E. coli* كمثال على البكتيريا سالبة الجرام (FimH).تم الكشف عن جينات مقاومة الأزيثرومايسين في بكتيريا *S. aureus* و *E. coli*.

واظهرت النتائج وجود علاقة ارتباط بنسبة 100% بين انواع الجينات في كلا النوعين من البكتيريا. اظهرت الفحوصات النسيجية المرضية لخزعات انسجة العظام وخزعات الانسجة الرخوة للمناطق المحيطية وجود عدد من التغييرات النسيجية بما في ذلك الاستجابة للحالات الالتهابية، والتي تتمثل في زيادة الخلايا الالتهابية الحادة والمزمنة، وكذلك ظهور نخر في مصفوفة الخلايا الالتهابية المزمنة المختلطة الثقيلة.

وزارة التعليم العالي والبحث العملي

جامعة الموصل

كلية العلوم

قسم علوم الحياة

التشخيص الجزيئي للبكتيريا المكونة للغشاء الحيوي المعزولة من التهاب العظم والنقي ودراسة بعض المتغيرات الكيموحيوية والنسجية للعينات

تمارا زياد طارق سعيد الفيل

رسالة ماجستير

علوم الحياة / الاحياء المجهرية

بإشراف

الاستاذ المساعد الدكتور صبا عبد السلام حامد السلطان

الاستاذ المساعد الدكتور اوس ابراهيم سليمان نادر

1446 هـ

2024 م