استمارة مستخلصات رسائل وأطاريح الماجستير والدكتوراه في جامعة البصرة

الكلية : الطب البيطري | **اسم الطالب : حسن اكريم ادبيس**
القسم :الاحياء المجهرية والطفيليات | **اسم المشرف :محمد حسن خضر**
التخصص : الاحياء المجهرية | **الشهادة : دكتوراه**

فعالية زيت القرفة المضادة للغشاء الحيوي في المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسلسن المعزولة من التهاب الضرع

ملخص الرسالة أو الأطروحة

الخلاصة

تم في هذه الدراسة جمع 300 عينة من الحليب بواقع 75 عينه لكل من الابقار والنعاج والماعز المصابه بالتهاب الضرع و من حليب النساء المرضعات المصابات بالتهاب الثدي ,تم جمع العينات خلال فترة سبعة اشهر (من مارس 2017 إلى سبتمبر 2017) . تم تحليل هذه العينات لغرض التحري عن وجود بكتريا المكورات العنقوديه الذهبيه واظهرت النتائج ان هذه البكتريا لوحظت بنسبة 23٪ من مجموع هذه العينات .
اعلى نسبه من بكتريا المكورات العنقوديه كانت في الابقار 26.66٪ تليها النساء 25.33٪ ، النعاج 21.33%ثم الماعز14%.
أظهرت دراسة اختبار الحساسية للمضادات الحيوية على 9 مضادات حيوية مختلفة أن بكتيريا المكورات العنقوديه كانت مقاومه 100٪ للبنسلين و 100٪ حساسة للفانكوميسين ، في حين كانت المقاومة للسيفوكسيتين (بديل للميثيسيلين) 55٪ .
وكانت نسبة المقاومة متغيرة لباقي المضادات الحيوية كمايلي: جنتاميسين (7.5 ٪) ، كلاريثروميسين (7 ٪) ، تتراسيكلين (30 ٪) ، سيبروفلوكساسين (20 ٪) ، الكليندامايسين (23 ٪) ، في حين اظهرت هذه البكتريا حساسية عالية للكلورامفينيكول (98.5) ٪.
تم تقييم مقدرة المكورات العنقودية الذهبية على تكوين الغشاء الحيوي عن طريق microtiter plates, اظهرتالنتائج أن جميع العزلات المدروسة كانت إما منتجه للغشاء الحيوي بصوره معتدله او ضعيفه ولا وجود للعزلات الغيرمنتجه او المنتجه بصوره قويه للغشاء الحيوي .
أظهرت العلاقة بين تكوين الأغشية الحيوية والمقاومة الميثيسيلين عدم وجود فروق معنوية (P> 0.05) بين انتاج الغشاء الحيوي بصوره ضعيفه او معتدله مع العزلات المقاومه او الحساسه للمثسيلين .
تم دراسة تثبيط تكوين الغشاء الحيوي بواسطة نصف التركيز المثبط الادنى لزيت القرفه و الديهايد القرفه بواسطة microtiter plate واظهرت النتائج أن هناك انخفاضا عالي المعنويه (p< 0.01)في الامتصاصيه (OD)للعزلات المعالجه مقارنة بالعزلات غير المعالجة و تغير تصنيف معظم العزلات من منتجه للغشاء الحيوي بصوره متوسطة إلى ضعيفة أو غيرمنتجه للغشاء الحيوي .تم استخلاص الحمض النووي من جميع عزلات المكوورات العنقوديه الذهبيه .استخدم اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل من اجل التحري عن الجينات المنتجه للبايوفيلم *icaA* و *icaD* .أظهرت نتائج الاختبار أن جميع العزلات أعطت نتائج إيجابية لكلا الجينين (100%) مع حجم المنتج 151 و 211 bp، على التوالي
تم إجراء تفاعل البلمره الحقيقي (تحليل التعبير الجيني النسبي) لدراسة تاثير نصف التركيز المثبط الادنى لالديهايد القرفه على التعبير الجيني للجينات المرتبطه بانتاج الغشاء الحيوي *icaA* و *icaD* حيث اظهرت النتائج ان التعبير الجيني لهذه الجينات انخفض بمعدل 8.7 و 4.6 اضعاف ,على التوالي, بالمقارنه مع مجموعة السيطره .
تم إجراء تضخيم جين (*spa*)بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل التقليدي وكانت جميع عزلات الدراسة تحتوي على هذا الجين باحجام مختلفه تتراوح بين 250 bp و 400 bp (polymorphism)
تم إرسال 25 عينة من منتج تفاعل البلمره المتسلسل لجين (spa) إلى شركة Macrogen (كوريا الجنوبية)لغرض فحص تسلسل الحمض النووي وتمت مقارنة تتابعات النيوكليوتيدات التي تم الحصول عليها مع تلك المتوفرة في بنك الجينات، وكشفت النتيجة ان نسبة التشابه تراوحت بين 98-100 ٪. أظهرت عشرة سلالات تغيرات في تسلسل النيوكليوتيدات ، تم تسجيل هذه السلالات العشرة في بنك الجينات NCBIتحت أرقام الدخول MF939108- MG874019- MH023323- MK130835-MK130836-MK130837-MK130838-MK130839-MK130840-MK130841.
علاوة على ذلك ، خضع تسلسل الحمض النووي لجينات *spa* للتنميط الجيني (spa typing) لاول مره في العراق باستخدام البرنامج Bionumerics Spa typing version 7.6 واظهرت النتائج وجود 10 أنواع مختلفة من spa types وهي (t386 ، t304 ، t2802 ، t12 ، t7685 ، t5428 ، t3576 ، t1534 ، t688 ، t9129) وكانت هذه الانواع متفاوته في الطول بين 3 (t386)و 10 (t012)مكررات. كما ولوحظ ارتفاع معدل تعدد الأشكال لجين (*spa*)في العزلات البشرية (5 أنواع مختلفة) ثم الأغنام (4 أنواع مختلفة من المنتجعات) و 3 أنواع مختلفة لكل من عزلات الابقار والماعز.
تم تحديد خمسة أنواع مختلفة من (spa type)في العزلات الحساسه للمثسيلين مقارنة بـ ستة عزلات مختلفه في العزلات المقاومه للمثسيلين وكان أكثر الأنواع انتشاراً في العزلات الحساسه للمثيسلين هو t2802 (46.66٪ (في المقابل كان t386 أكثر الأنواع انتشاراً في العزلات المقاومه للمثسيلين وبنسبة 30%.
كما وجد ان جميع العتر التابعه لكل نوع من انواع spa type لها نفس القدره على تكوين الغشاء الحيوي وتتاثر بنفس التركيزالمثبط الادنى والمثبط القاتل لزيت القرفه والديهايد القرفه .تم رسم الشجره الوراثيه بالاعتماد على جين ال spa لخمسه وعشرون عتره واظهرت النتائج ان 23 عتره (9 spa types) اجتمعت في النسب الاول وعترتين(single spa type) فقط اجتمعت بالنسب الثاني .

College: Veterinary Medicine | **Name of student:** Hasan Ikareim Idbeis
Dep: Microbiology and Parasitology | **Name of supervisor:** Mohammed H. Khudor
Certificatte:phD | **specialization:** Microbiology

Antibiofilm Activity of Cinnamon Oil Against Biofilm-Methecillin Resistance *Staphylococcus aureus* Isolates from Mastitis

Summary

mastitis milk samples were collected from cow , ewe , goat and lactating woman (75 for each one) during seven month (from March 2017 300 In the present study, a total of to September 2017.) and were analyzed for the presence of *Staphylococcus aureus.*

The obtained results indicate that this bacterium observed in 23% from the samples and the high rate of *S.aureus* was observed in the cow 26.66% followed by lactating woman 25.33%, ewe21.33 and goat 18.66%.

The study of antibiotic susceptibility test to 9 different antibiotics showed that *S. aureus* was 100% resistant to penicillin and 100% sensitive to vancomycin, whereas for cefoxitin (alternative to methicillin) resistance was 55%.There were a variable resistance percentage for the rest of antibiotics: Gentamycin (7.5%), clarithromycin (7%), tetracycline (30%), ciprofloxacin (20%) , clindamycin (23%), whereas they showed high sensitivity to chloramphenicol (98.5%).

The biofilm-forming ability of *S. aureus* was evaluated via microtiter plates and the result revealed that, all the studied isolates were either moderate biofilm producer or weak biofilm producer while the non-biofilm producer and strong biofilm producer were not detected among the tested isolates.

The relationship between biofilm formation and resistance to methicillin showed that there were no significant differences (P>0.05) in the percentage of weak and moderate biofilm formation between MRSA and MSSA isolates.

Inhibition of biofilm formation by 0.5×MIC of cinnamon oil and cinnamon aldehyde were studied by microtiter plates and the results revealed that there was a significant reduction (p< 0.01) in the absorbance (OD) measured compared to the non-treated isolates and the classification of the most isolates were changed from moderate to weak or non-biofilm produce.

PCR analysis was applied to DNA which was extracted from *S.aureus* isolates from milk samples .The results of PCR assay revealed that all *S.aureus* isolates gave positive results for both icaA and icaD genes (100%) with Product size 151 and 211 bp, respectively.

Real-time PCR (relative gene expression) analysis was performed to determine the effect of sub-MIC concentrations of cinnamon aldehyde on expression of the biofilm-related genes (*icaA* and *icaD*) and the result showed that, *icaA* and *icaD* genes were remarkably down regulated 8.7 -and 4.6- fold change, respectively, in comparison with the control group.

Amplification of the *spa* gene was done by conventional PCR and all the study isolates were positive for *spa* gene with variable amplicon size ranged from 250bp and 400 bp (polymorphism).

Twenty five PCR product samples of spa genes were sent to Macrogen (Seoul, South Korea) for DNA sequencing. The obtained sequences were compared with those -100%. Ten strains showed changes in nucleotides sequence, this ten strains were 8available in the NCBI, the result revealed that the identity of blasting sequences ranged from 9 registered in the NCBI Gen Bank under the accession numbers MF939108- MG874019- MH023323- MK130835-MK130836-MK130837-MK130838-MK130839-MK130840-MK130841.

Moreover, the DNA sequence of *spa* genes were subjected to Spa typing analysis using software package Bionumerics Spa typing plugin version 7.6 and the result revealed 10 different spa types(t386, t304, t2802, t12, t7685, t5428, t3576, t1534, t688, t9129) varying in length between 3(t386) and 10 (t012) repeats. Higher rate of polymorphism was observed in human isolates (5 different spa types) flowed by sheep (4 different spa types) and 3 different spa types for both cow and goat isolates.

Five different spa types were identified in the MSSA isolates compared to 6 in the MRSA isolates. The most prevalent spa type within the MSSA was t2802 (46.66%) in contrast, t386 was the most prevalent spa type within the MRSA isolates (30%). Moreover, the same spa type had same degree of biofilm formation and same MIC and MBC of cinnamon oil and cinnamon aldehyde.

The phylogenetic tree was constructed based on *spa* gene sequences of 25 strains and the result showed 23 strains (9 spa types) were clustered into lineage I .In contrast, lineage II included only 2 strains (single spa type).