



جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى
كلية العلوم
قسم علوم الحياة



النشاط المضاد للميكروبات للكولستن ممزوجاً مع بعض المعززات الحيوية ضد العزلات السريرية لبكتريا الراكدة البومانية

رسالة مقدمة الى

مجلس كلية العلوم - جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من قبل الطالب

مناف ثامر صالح الدليمي

بكالوريوس علوم حياة / جامعة ديالى (٢٠١٠)

بإشراف

أ.م.د. علياء معن عبد الحميد

أ.م.د. عمار رياض قاسم

٢٠٢١ م

١٤٤٢ هـ

1. Introduction

Acinetobacter baumannii is a Gram-negative, obligate aerobe, coccobacillus and one of the most prevalent causative agent of several infections (Martín-Aspas *et al.*, 2018). *A. baumannii* causes a range the hospital and community-acquired infections, including skin and soft tissue, urinary tract infections, in addition to meningitis, bacteremia and pneumonia (Morris *et al.*, 2019). This pathogen is one of the multidrug-resistant (MDR) ESKAPE pathogens (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter* species) (Shin and Eom, 2020). *A. baumannii* is capable to develop resistance mechanisms to a wide range of antimicrobial agents (Ibrahim, 2019). Basically, *A. baumannii* has three main mechanisms of antibiotics resistance, including: (i) disactivating of antibiotics by enzymes, (ii) delaying entrance of antibiotics into the target site of bacteria and (iii) alteration of their target or cellular functions (Hamzeh *et al.*, 2019).

Biofilm-forming capability and antibiotic resistance are the most important virulence factors of *A. baumannii* playing an important role in bacterial survival and infection (Raheem *et al.*, 2018). Biofilm is defined as a microbial aggregate embedded inside a self-released extracellular polymeric material including proteins, polysaccharides and extracellular DNA (Shin and Eom, 2020).

The antibiotic resistance in *Acinetobacter* infections had led to the use of the old generation of antibiotics, such as Colistin (Asif *et al.*, 2018). Polymyxin E (or Colistin) has recently been used as a “last line” therapeutic substance to control the Gram-negative multi-drug resistant bacteria (Pacheco *et al.*, 2019). Colistin is a cationic antimicrobial peptide that affects the lipid A moiety of lipopolysaccharide (LPS) of Gram-

negative bacteria and eventually, disrupting the outer membrane of bacterial pathogens (Farshadzadeh *et al.*, 2018).

The monotherapy by antibiotics has been reported as a less effective protocol, in comparison to combination therapy, thus, antimicrobial combinations are recommended by the National Institutes of Health (NIH) as a potential integrative therapeutic option (Mosca *et al.*, 2020). Therefore, an effective approach of combinations is urgently required, using the new technologies, to find out and develop alternative and safe strategies in order to encounter bacterial resistance to antibiotics. One of the suggested methods is using probiotics and/or their metabolites as antimicrobial substances in combination with antibiotics to increase the sensitivity of pathogenic strains (Isayenko *et al.*, 2020).

Probiotics are known as live microorganisms that provide health benefits when administered in appropriate amounts (Saud *et al.*, 2020). Probiotics play a key role in the regulation of the host immune system by stimulating cytokine production and cellular activity and inhibit the colonies of pathogens (Hager *et al.*, 2019). In addition, probiotic therapeutic properties are attributed to the production of a variety of antibacterial agents, such as short-chain fatty acids, organic acids (such as lactic, acetic, formic, propionic and butyric acids), ethanol, hydrogen peroxide and bacteriocin (Karacaer *et al.*, 2017).

The combination of Colistin, *in vitro*, with the other active antimicrobials that reported have a synergistic effect, is widely used by physicians in critical patients (Asif *et al.*, 2018). These effective combinations have several advantages; including lower concentrations of antimicrobials are used with higher activity, in addition to reducing their cost and their toxic threatening side effect on human health (Isayenko *et al.*, 2020).

Our study aimed to:

- 1- evaluate, *in vitro*, the antibacterial and anti-biofilm activity of the probiotic strains and their metabolites cell-free supernatants (CSF) alone and in combination with Colistin against *A. baumannii* using disc diffusion method and broth microdilution assay (Checkerboard assay).
- 2- In addition, the demonstrat the co-aggregation potential of probiotic strains with *A. baumannii*.
- 3- Detection of the synergy effect of the Colistin in combination with probiotic CSFs against multidrug-resistant *A. baumannii* .

البومانية (١٠٠%) كانت حساسة للكولستن و(٨٥%) منها كانت حساسة تايجيسايكلين ومونوسايكلين. تم تحديد غالبية ١٣ (٦٥%) من عزلات الراكدة البومانية على أنها مقاومة للأدوية على نطاق واسع (XDR) و٧ (٣٥%) منها كانت مقاومة للأدوية المتعددة (MDR).

لم يظهر الراشح البكتيري للمعزلات الحيوية الاتية : *Bacillus subtilis* KATMIR1933 و *Bacillus amyloliquefaciense* B-1895 أي نشاط (حتى عند استخدام ١٠٠%) ضد عوالم بكتيريا الراكدة البومانية ولكن كان تأثيره طفيفاً على تكوين الأغشية الحيوية للراكدة البومانية. في حين تم تسجيل نشاط مضاد للميكروبات قوي وكذلك تأثير مضاد للغشاء الحيوي المكون من قبل الراكدة البومانية عندما تم استخدام ٥٠% (MIC و MIC-B) من الراشح البكتيري من خلايا عصيات اللبنية *Lactobacillus casei* CNCMi 1572 والعصيات اللبنية المخلوطة mixed lactobacilli مما تسبب في تثبيط (١٠٠%) من الأغشية الحيوية المكونة بواسطة الراكدة البومانية.

أظهرت الدراسة أن النسبة المئوية للتجمع المشترك (Co-aggregation) بين سلالات المعزلات الحيوية والراكدة البومانية كانت أعلى مقارنة بالتجمع الذاتي (Auto-aggregation). كان التجمع الذاتي لعصيات *Bacillus amyloliquefaciense* B-1895 أعلى مما لوحظ في *Bacillus subtilis* KATMIR1933 و *L. casei* CNCMi 1572 وكذلك mix lactobacilli.

بناءً على تطبيق الـ isobologram وإجمالي التركيز المثبط الجزئي ($\sum FIC$) فإن الراشح البكتيري من خلايا سلالات المعزلات الحيوية كان متآزراً مع الكولستن ضد كلا من عوالم الخلايا والأغشية الحيوية لثلاث عزلات من الراكدة البومانية المختارة في هذه الدراسة والمعزولة من الجروح والحروق والدم. كان MIC و MIC-B للكولستن بالاشتراك مع الراشح البكتيري من سلالات المعزلات الحيوية (*Bacillus subtilis* KATMIR1933 و *Bacillus amyloliquefaciense* B-1895 و *Lactobacillus casei* CNCMi 1572 و mix lactobacilli) أقل مقارنة باستخدامه بمفرده ضد عزلات الراكدة البومانية.

من خلال هذه الدراسة توصلنا إلى أن كولستن تزداد فعاليته المضادة للميكروبات عندما يمزج بالراشح البكتيري لسلالات المعزلات الحيوية وبالتالي سيتم استخدام تركيز أقل من هذا المضاد الحيوي مما يقلل بدوره من الآثار الجانبية التي يسببها الكولستن.