جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

كلية العلوم

قسم علوم الحياة

الفعالية البكتيرية للمعززات الحيوية لبكتريا حامض اللبنيك مع السيبروفلوكساسين ضد الأنواع البكتيرية المعزولة من التهاب الاذن الوسطى

رسالة مقدمة إلى مجلس كلية العلوم - جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة

من قبل الطالبة

شيرين مؤيد جاسم

بكالوريوس علوم الحياة / جامعة بغداد (2005)

بإشراف

أ.م. د عمار رياض قاسم

١٤٤٤ هـ

٢٠٢٢ م

Repuplic of Iraq

Ministry of Higher Education

and Scientific Research

University of Diyala

College of Sciences

Department of Biology

Antibacterial Activity of Probiotics of Lactic Acid Bacteria with Ciprofloxacin Against Bacterial Species Isolated From Otitis Media Infection

A Thesis

submitted to the Council of College of Science/ University of Diyala In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science In Biology

By

Shireen Moyaed Jassim

B.Sc. in Biology/College of Science/ University of Baghdad (2005)

Supervised by

Dr. Ammar Riyadh Qasem

Assistant Professor

2022 A.C **1444A.H**

Chapter One

Introduction

Introduction

Ear infections, otitis media and otitis externa, are common worldwide conditions that affect both genders in all age groups; infants, children, and adults. Otitis media (OM) is an infection of the middle ear that affects patients, children, and outpatients who use antibiotics randomly (Meherali *et al.*, 2019). The consequences of OM infection include hearing loss, recurrent acute otitis media, persistence of middle ear effusion, mastoiditis, and chronic otitis media (Protasova *et al*., 2017). Otitis externa (OE) is an infection of the skin of the outer ear canal that is characterized by acute otalgia, ear discharge, and hearing loss in all age groups. Otitis externa has a significant influence on the quality of someone's lifestyle, sleep, and work or exercise (Barry *et al.*, 2021).

Otitis media is a polymicrobial infection caused by viruses, bacteria, fungi, or a combination of these microbial agents. In regards to bacterial otitis media, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarhalis*, and *Haemophilus influenza* are the most commonly caused acute cases (AOM) (Ubukata *et al.*, 2018). *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* spp., *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli*, as gram-negative species, and *Staphylococcus* spp., as gram-positive species, are the most etiological agents of chronic infections . The most predominant pathogens associated with otitis externa are *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*.

These microbial agents, such as gram-negative species, in addition to causing otitis media infection, can infect every system in the human body, including the digestive system, neurological system, urinary system, and bloodstream, producing diarrheal gastroenteritis, urinary tract infections, bacteremia, and meningitis. While gram-positive bacteria such as *Staphylococcus aureus*, which are found on the skin and mucous membranes, also cause multiple human infections, including

bacteremia, infective endocarditis, skin and soft tissue infections (e.g., impetigo, folliculitis, furuncles, carbuncles, cellulitis, scalded skin syndrome, and others), osteomyelitis, septic arthritis, prosthetic device infections, pulmonary infections (e.g., pneumonia, empyema, gastroenteritis, meningitis, toxic shock syndrome, and urinary tract infections) (Lee et *al*., 2016).

There are several factors that contribute to the development of otitis media, including cold infections, influenza, allergies, and asthma, in addition to age, gender, socioeconomic status, poor hygiene, breastfeeding, and others (Ardç and Yavuz, 2018).

Controlling of such infection is a challenging issue. Antibiotics are commonly prescribed by physicians in order to eliminate the bacterial otitis media. However, abuse and/ or overuse of these antibiotics lead to develop and emerge of multi-drug-resistant bacteria which are an important health problem associated with increasing mortality and morbidity rates. Furthermore, antibiotic resistance of otopathogens are mostly related to their capability to polymicrobial biofilms formation (Chan *et al*., 2017)

Biofilms defined as bacterial clusters that are adhered to a surface and to each other and embedded in a self-produced matrix composed of proteins (for example, fibrin), polysaccharides (for example, alginate), and extracellular DNA (Paluch *et al*., 2020).

Therfore, it is important to find an alternative antimicrobial therapies that are inhibit/kill the resistant microorganisms and possess long-term effect such as selection of the nanoparticle, essential oils, and probiotics (Deyno *et al* ., 2019).

Probiotics are defined by the World Health Organization (WHO) as living microorganisms that provide a health benefit to the host when given in sufficient amounts (FAO/WHO, 2002; Hao *et al*., 2015)

Antimicrobial activity of Lactic Acid Bacteria (LAB) and their metabolite (s) alone and in combination with traditional antibiotics were reported in many publications. Antimicrobial combinations have advantages include; lowering the doses of the antimicrobials that used to control infections, in addition to reduce the cost and toxic side effects when antibiotics were administered alone in high concentrations.

The aim of the study:

Investigation of biological activity of Lactic Acid Bacteria in combination with antibiotic Ciprofloxacin against bacterial spp. isolated from patients with otitis media due to the anti-microbial resistance development .

For this aim, the following goals were performed:

1- Isolation and identification of bacterial species isolated from otitis media by bacteriological and biochemical methods.

2- Co-culturing and co-aggregation of the tested LAB with the pathogenic bacteria isolated from otitis media and externa site into the same culture media to evaluate LAB capability of competition and aggregation with the isolated bacterial pathogens.

3- Antimicrobial activity of LAB and their metabolite (s) alone and in combination with the conventional antibiotics and determine their minimum inhibitory concentration (MIC) when combined together .

4- Evaluation of anti-biofilm activity of Bio-surfactant (BS) and Cell Free Supernatant (CFS) of LAB against isolated pathogens using broth micro dilution to determine their minimum biofilm inhibitory concentration .

الخلاصة

في الدراسة الحالية ، تم جمع مائة واثنين وستين مسحة أذن من حالات التهاب الأذن الوسطى مع إفرازات مزمنة. حضر هؤلاء المرضى إلى قسم الأنف والأذن والحنجرة في العيادة الاستشارية الطبية في مستشفى بعقوبة التعليمي وكذلك إلى عيادات الأطباء الخاصة. تم أخذ مسحات الأذن من كلا الجنسين ذكوراً وإناثاً اعتباراً من أيلول ٢٠٢١ وحتى نهاية كانون الأول من نفس السنة. تم تشخيص العزلات مبدئيا بناءً على شكلها المظهري لمستعمراتها وبعض الاختبارات البايوكيميائية لها. تم تأكيد التشخيص النهائي وحساسية العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية بواسطة جهاز ال VITEK2.

أظهرت النتائج أن ١١٣ من ١٦٢عينة كانت موجبة للزراعة البكتيرية ، بينما كانت ٣٠عينة سالبة النمو. الانواع البكتيرية المعزولة من التهاب الأذن الوسطى المزمن كانت كالاتي:٥٢ (٣٢,١ ٪) *P. aeruginosa* و٤٠ (٢٤,٧ ٪) *S. aureus* ، تليها١٤(٨,٦٤٪) *P. mirabilis* و ٧ (٤,٣٢ ٪) *K. pneumoniae* و أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن أعلى معدل إصابة تم تحديده عند الذكور اكثر من الإناث.

تم إجراء اختبار الحساسية للمضادات الحيوية على الأربعة أنواع من البكتيريا باستخدام ١٦ مضادًا حيويًا باستخدام جهاز ال -VITEK2. كانت حساسية الأنواع البكتيرية مختلفة لهذه المضادات الحيوية. لوحظ أن سيبروفلوكساسين كان المضاد الحيوي الأكثر فعالية ضد جميع الأنواع البكتيرية المدروسة وبأقل تركيز مثبط أدنى (MIC) مقارنة بالمضادات الحيوية الأخرى.

في هذه الدراسة ، تم تقييم تأثير سيبروفلوكساسين بمفرده كذلك عند خلطه مع الراشح البكتيري من خلايا طافية (CFS) لسلالات العصيات اللبنية ضد العزلات الأربع باستخدام طريقة انتشار القرص. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن الراشح البكتيري CFS) الذي تنتجه سلالات العصيات اللبنية (*Lactobacillus*) له تأثير مثبط كبير على نمو مسببات الأمراض البكتيرية. علاوة على ذلك ، كان الراشح البكتيري مع سيبروفلوكساسين أكثر فعالية ضد العزلات المسببة للأمراض من استخدام سيبروفلوكساسين وحده.

الخلاصة

تم تحديد التركيز المثبط الأدنى لراشح العصيات اللبنية (CFS) المختبرة و سيبروفلوكساسين ضد العزلات البكتيرية باستخدام طريقة التخفيف الدقيق للمرق. أظهرت النتائج أن الراشح البكتيري (CFS) من خلايا *L. acidophilus* له تأثير مثبط عند تركيز ٢٥٪ (MIC90) ضد *S. aureus* و *P. mirabilis* و *K. pneumoniae* وبتركيز ٥٠ ٪ ضد *P. aeruginosa*. بينما كان الراشح البكتيري لخلايا العصيات اللبنية المخلوطة mixed lactobacilliله تأثير مثبط عند ٢٥٪ (MIC90) ضد *P. mirabilis* و ٥٠ ٪ ضد *P. aeruginosa* و *S.aureus* و *K. pneumoniae*.

تعتبر طريقة رقعة الشطرنج أفضل طريقة للكشف عن طبيعة التفاعلات المضادة للميكروبات للسيبروفلوكساسين مع الراشح البكتيري(CFS) لأنواع العصيات اللبنية ضد العزلات البكتيرية. أظهرت النتائج وجود تأثير تآزري عندما تم دمج الراشح البكتيري(CFS) لكلا النوعين من العصيات اللبنية مع سيبروفلوكساسين ضد البكتيريا سالبة الجرام وموجبة الجرام. ومع ذلك، تم تسجيل تأثير مضاد عندما تم دمج الراشح البكتيري من خلايا العصيات اللبنية *L. acidophilus* مع سيبروفلوكساسين ضد *S. aureus* و *K. pneumoniae*.

تشمل الدراسة أيضًا التجميع الذاتي والتجميع المشترك بين أنواع العصيات اللبنية ومسببات الأمراض البكتيرية الأربعة. وجدنا أن جميع سلالات العصيات اللبنية أظهرت قدرات على التجميع المشترك مع مسببات الأمراض لألتهاب الأذن الوسطى الجرثومي، وكانت أعلى نسب للتجميع المشترك بعد ال ٢٤ ساعة. كان التجميع الذاتي للعصيات اللبنية المختلطة أعلى من تجمع العصيات اللبنية *L. acidophilus*.

تم تقييم الفعالية البايلوجية المضادة للغشاء الحيوي للراشح البكتيري (CFS) والمستحلب الحيوي Biosurfactant (BS) لسلالات العصيات اللبنية ضد العزلات البكتيرية المعزولة. أظهرت النتائج أن العصيات اللبنية لبكتريا *L. acidophilus* أظهرت تثبيطًا قويًا للغشاء الحيوي (١٠٠٪) ضد *S. aureus* عند استخدام تركيز ٥٠٪ من الراشح البكتيري (CFS). كانت نسبة MBIC-50 من الراشح البكتيري لبكتريا ال *L. acidophilus* ١٢,٥٪ و ٦,٢٥ ٪ و ٢٥٪ ضد *P. aeruginosa* و *P. mirabilis* و *K. pneumoniae* على التوالي. لم

الخلاصة

يظهر المستحلب الحيوي (BS) لبكتريا *L. acidophilus* أي نشاط ضد بكتريا *S. aureus* حتى عند استخدام تركيز ٥٠٪ منه، بينما لوحظ تثبيط نمو الغشاء الحيوي لبكتريا ال *P. aeruginosa* و *P. mirabilis* و *K. pneumoniae* بنسبة ٥٠٪ و ٢٥٪ و ٥٠ ٪ على التوالي.

فيما يتعلق بـراشح بكتريا العصيات اللبنية المختلطة، فقد أظهر تثبيط للغشاء الحيوي أعلى ضد *K. pneumoniae* بنسبة ٥٠ ٪ وكانت نسبة MBIC-50 لراشح العصيات اللبنية المختلطة ١٢,٥٪ و ٦,٢٥٪ و ١٢,٥٪ ضد بكتريا *P. aeruginosa* و *S. aureus* و *P. mirabilis* على التوالي. بينما لوحظ ان المستحلب الحيوي لبكتريا العصيات اللبنية المختلطة له تثبيط على تكوين الأغشية الحيوية ضد *P. aeruginosa* عند مستوى أعلى من MBIC-50 وضد *S. aureus* و *P. mirabilis* و *K. pneumoniae* بنسبة ٥٠٪ و ١٢,٥٪ و ٥٠% على التوالي.