وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

التحري الجزيئي لتسلسل جينوم كامل لبكتريا *Klebsiella pneumoniae* المقاومة للأدوية المتعددة باستخدام تقنية Next generation sequence

اطروحة مقدمة

إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة بجامعة ديالى وهي جزء من متطلبات نيل درجة الدكتوراه فلسفة في علوم الحياة

من الطالب

عبدالستار عبدالجبار ابراهيم اللهيبي

بكالوريوس علوم حياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى2012

ماجستير علوم حياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى 2015

إشراف

ا.م.د عدوية فاضل عباس **ا.م.د مثنى عبدالقادر المهداوي**

1444هـ **2023م**

Ministry of Higher Education and Scientific Research

University of Diyala

College of Education for Pure Sciences

Department of Biology

Molecular investigation of a whole genome sequence of bacteria *Klebsiella pneumoniae* multidrug resistance using a technique Next generation sequence

A Thesis
Submitted to the Council of the College of Education for Pure Sciences,University of Diyala in partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctorate of philosoply in Biology

By

Abdul Sattar Abdul Jabbar Ibrahim

B.Sc.Biology-College of Education for Pure Sciences 2012

M.Sc. Biology - College of Education for Pure Sciences

University of Diyala , 2015

Supervised by

Dr.Adawiya Fadel Abbas **Dr.Muthanna Abdul Qadir**

2023 A.D 1444 A.H

١: المقدمة introduction

تُعد بكتيريا *K. pneumoniae* أهم أنواع جنس *Klebsiella* وتعود الى العائلة المعوية (Enterobacteriaceae). تعتبر *K.pneumoniae* من اهم البكتريا السالبة لصبغة كرام التي تسبب اصابات خطرة اضافة الى معدلات الوفيات العالية التي تحصل في المستشفى (Martin و Bachman ، 2018). تنتشر هذه البكتريا بشكل واسع في الطبيعة ويمكن عزلها من التربة والمياه والنباتات فضلاً عن تواجدها على اجزاء مختلفة من جسم الإنسان والحيوان.(Kumar وآخرون، 2011) .إذ تكون من المسببات الشائعة لأخماج المستشفيات (Nosocomial infection) إذ ترافق المرضى من كبار السن والأطفال حديثي الولادة وهي من الممرضات الأنتهازية (Opportunistic) وتسبب الكثير من الأخماج (Shilpa واخرون ، 2016).

تمتلك *K.pneumoniae* العديد من عوامل الضراوة (virulence factors) وتميزها بخصائص المقاومة للمضادات الحيوية إذ إنها تمتلك المحفظة (Capsule) والاهداب (Fimbriae) التي تساعد البكتريا على الألتصاق على الأسطح المخاطية والأنسجة الحيوانية، فضلا عن إمتلاكها الكثير من الأنزيمات تجعلها مقاومة للمضادات الحيوية اهمها أنزيمات (β Lactamase) وانزيمات الكاربابينيميز (Liu واخرون ، 2018) . تشير الدراسات الحديثة والمتعلقة بانتشار الامراض والاوبئة ان السلالات التابعة لجنس الكليبسلا اصبحت مقاومتها الحالية للمضادات الحيوية في حالة ازدياد مما جعلها تنتشر بشكل كبير في جميع انحاء العالم، (Suay و Pérez ، 2019).

فضلا عن ذلك فأن هذه البكتريا أصبحت تمتلك مقاومة عالية للمضادات الحيوية المستخدمة في العلاج نتيجة أكتسابها لبلازميدات المقاومة إذ وجد أن هذه البكتريا تنتج أنزيمات

البيتالاكتاميز واسعة الطيف (Extended spectrum β–lactamase) (Khalifa واخرون ، 2021).

تعتبر *K pneumoniae* كائن ممرض للانسان اذ تسبب ارتفاع في معدل الوفيات وتمتاز بانتشارها العالمي وهذا الانتشار ادى الى ظهور سلالات جديدة تحمل صفات وراثية اضافية جعلتها اما ان تكون شديدة الضراوة او مقاومة للمضادات الحيوية (Rocker واخرون ، 2020). مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية تكون اما ذاتية (طبيعية) أو مكتسبة لكن ازدادت هذه المقاومة من قبل بعض البكتريا من اجل التكيف مع البيئة عن طريق تعديل الجينوم الخاص بها اما من خلال الطفرات أو النقل الأفقي للجينات (Bonev و Brown، 2019). ومما يجدر الأشارة اليه أن غالبية الجينوم يتكون من جينات اضافية (Accessory genome) التي تحدث بسبب انتقال الجينات افقياً (Bajpai واخرون ، 2017)

أن التطور والتقدم العلمي في مجال التشخيص الجزيئي للبكتريا وتوفر التقنيات التي تعطي نتائج ايجابية وسريعة في تشخيص العديد من المسببات المرضية حفز الباحثين على استعمال تقنية التسلسل الجينوم الكامل (whole genome sequence (WGS الذي حدث عنه ثورة في علم الأحياء المجهرية الطبية وأدى إلى انتقال تشخيص المقاومة والتنبؤ بها من النمط الظاهري الى النمط الجيني(Gracielaوآخرون، 2015) . ويمكن لتقنيات التسلسل وطرق البحث الحديثة ان تترجم النتائج السريرية بسرعة والكشف السريع للجينات المقاومة للأدوية في مسببات الأمراض (Didelot واخرون ، 2016)

حديثا تم ابتكار العديد من الأدوات المصممة لتنميط العزلات البكتيرية من بيانات NGS احد هذه الادوات واكثرها توفرا وتقدما بالنسبة لادوات المعلوماتية الحيوية bioinformatics المتوفرة عبر الإنترنت هي مركز علم الأوبئة الجينومي (CGE) Center Genomic Epidemiology (Clausen واخرون ، 2018).ان التقدم الأخير في تقنيات تسلسل الجيل

التالي (NGS) التي تقدم فرصًا ممتازة لدراسة الجزيئات الكبيرة البيولوجية مثل حمض (DNA) الذي يشفر للمعلومات الأولية لمختلف الصفات البيولوجية ولدراسة جينات المقاومة والبلازميدات في جينوم البكتيريا (Dimitriu واخرون ، 2019).

ولأهمية *K. pneumoniae* في إحداث الكثير من الامراض و زيادة مقاومتها للمضادات الحيوية وامتلاكها العديد من عوامل الضراوة والبلازميدات التي تساعدها على الانتشار والتكييف مع الظروف البيئية الجديدة لذا جاءت هذه الدراسة لتهدف الى :

١- التحري عن بكتريا *K. pneumoniae* وعزلها من عينات سريرية مختلفة وبيئية (مياه آسنة) وتشخيصها بطرق مختلفة

٢- فحص الحساسية الدوائية للمضادات الحيوية وتحديد نمط المقاومة للعزلات البكتيرية.

٣- التشخيص الجزيئي للعزلات البكتيرية متعددة المقاومة للمضادات الحيوية MDR وذلك باستخدام جين 16srRNA

٤- دراسة التركيب الجيني للعزلات المقاومة للمضادات الحيوية بتقنية التسلسل الكامل للجينوم whole Genome sequence

٥- تحليل الجينوم باستخدام المعلوماتية الحيوية bioinformatics

٦- اجراء تقييم لجينات المقاومة للمضادات الحيوية والبلازميدات في العزلات البيئية والسريرية باستخدام Next Generation Sequence (NGS)

Summary

Two hundred seventy eight of clinical samples were collected from subjects suffering from various diseases as well as 50 environmental samples. The clinical samples included (130) urine samples, (83) sputum samples, (36) wound samples, (15) burn samples, and (14) blood samples, collected during the period from December 2021 to May 2022 at Baquba Teaching Hospital / Diyala. All samples were subjected to culture and bacterial diagnosis.

The results showed that 62.9% (175) samples were positive for bacterial culture, while 37.1% (103) samples were negative for bacterial culture. The isolates were diagnosed using chemical and molecular methods. The results showed that 39.4% (69) of the isolates were *Klebsiella pneumoniae*, and their percentage was in urine. 32.3% (42), sputum 20.5% (17), wounds 19.4% (7), burns 13.3% (2), blood 7.1% (1), and water 10% (5).

The results of the drug sensitivity test showed that 59.4%(41) isolates of *K.pneumoniae* bacteria, which showed clear growth on Mueller-Hinton medium, using the Kirby–Bauer disc diffusion method, possessed different resistance towards the antibiotics used under study. The rate of resistance to Ceftazidime was 100%, Meropenem %95.12, Ceftriaxone %92.68, Ticarcillineclavulanate %92.68, AmoxicillinClavulanic %87.80, Trimethoprimesulfame thouxazole %78.04, Azithromycin %68.29, Piperacillintazobactam %60.97, Amikacin %48.78, Ciprofloxacin 46.34%,Imipenem 46.34%,Levofloxacin 43.90%.

The results of the antibiotic sensitivity test showed that 78% (32) of the *K.pneumoniae* isolates had multidrug resistance, and the results showed that 22%(9) of them were Extensiv drug resistant (XDR) isolates

Summary

To study the whole genome sequence of the *Klebsella pneumoniae* bacterium, 2 clinical isolates of different origin and resistance to all antibiotics, and 2 environmental isolates were identified by means of the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique To detect the sequences of the *16SrRNA* gene, as the results showed that the four isolates possessed sequences of this gene with a match rate of 100% with the sequences found in NCBI for the above gene.

To find out the NGS sequence of the isolates, the results were analyzed using the iseq100 device and bioinformatics tools kmerfinder, Resfinder, plasmidfinder to know the epidemiology and spread of resistance genes and plasmids. As follows, isolate (k1) contains genes (*OqxB, fosA, rpsL*)) and isolate (k2) contains genes (*acrR, OqxA*), while isolate (2) was found to carry genes (*blaCTX-M-71, blaTEM-1B, sul2, dfrA14, OqxA, OqxB, fosA, acrR, ompK37, aph(3'')-Ib,* and isolate (5) were found to carry the genes (*rmtF, aac(6')-Ib-cr, blaCMY-6, blaCTX-M- 15, blaNDM-6, sul1, fosA, tet, ARR-3 , OqxB, OqxA, ompK37, blaTEM-1B , acrR*).

As for plasmids, the results of the study showed that isolate k1 carried the IncFIB(K) plasmid, while isolate k2 did not carry any plasmid. The results showed that isolate 2 carried the plasmids IncFIB(K), IncFII(K), while isolate 5 carried the plasmids Col440I, IncC, IncFIA IncFIB(AP001918), IncFIB(pQil), IncFII(K)

The results showed that there were mutations in some of the genes of the study isolates, as follows: isolate K1 (*RpsL, ompK36, ompK37*), isolate K2 (*AcrR*), isolate 2 and 5 (*AcrR, ompK36, ompK37*).