جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

كلية العلوم

قسم علوم الحياة

التنوع الجزيئي في بعض عزلات *Klebsiella pneumoniae* من مرضـــى في مدينة بعقوبـــة

رسالة مقدمة إلى مجلس كلية العلوم– جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة

من قبل الطالبة

غـــادة عبد الامير ابراهيم الشابندر

بكالوريوس علوم الحياة / كلية العلوم/ الجامعة المستنصرية /2000

إشراف

د. هادي رحمن رشيد الطائي

(أستاذ)

1445هـ **2023 م**

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
and Scientific Research
University of Diyala
College of Science
Department of Biology

Molecular diversity in some isolates *Klebsiella pneumoniae* from patients in Baquba city

A Thesis

Submitted to the College of Science, University of Diyala in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master Degree of Science in Biology

By

Ghada Abdul-Ameer Ibrahem Al-Shabender

B.Sc. Biology/ College of Science/ Al-Mustansiryah University/2000

Supervised by

Dr. Hadi Rahman Rasheed Al-Taai

(Professor)

2023 A.D **1445 A.H**

Chapter One: Introduction

1.1.Introduction

Klebsiella pneumoniae is a gram-negative encapsulated bacteria that thrives on the mucosal surfaces of mammals, soil, vegetation, and water. In humans, *K. pneumoniae* typically colonizes the oropharynx and gastrointestinal tract, from where it can easily enter the circulation and other tissues, causing infections such as bacteremia, septicemia, surgical site infection, urinary tract infection, hospital-acquired pneumonia, and ventilator-associated pneumonia (Liu *et al.,* 2022).

Klebsiella pneumoniae has some virulence factors, such as capsule, endotoxin, siderophore, iron scavenging system, and adhesins, which play a crucial role in its pathogenesis *(*Ahmadi *et al.,* 2022). The polysaccharide capsule was one of the first and most widely studied virulence factors in in *vivo* pneumonia models, and it is essential to establishing lung infection despite local immune responses (Joseph *et al*.,2021).

Antibiotic resistance is a major global health concern, resulting in significant financial losses due to the inappropriate use of antibiotics (Canica *et al*.,2019). *K. pneumoniae* strains are more often multi- and extensively drug-resistant (MDR, XDR), thus limiting therapeutic options for treating infections that are caused by *K. pneumoniae* (Li *et al*.,2020).

Antibiotic resistance in gram-negative bacteria occurs due to enzymatic and non-enzymatic mechanisms (Vuotto *et al*.,2017). Enzymatic pathways are imposed by the expression of antibiotic-inactivating enzymes, while resistance is due to changes in efflux pumps, membrane permeability, or target molecules (Ahmadi *et al.,* 2022). Beta-lactamase enzymes, such as extended-spectrum beta-lactamase (ESBL), Amp^{C} beta-lactamases, and carbapenemase, are responsible for resistance to beta -lactam antibiotics such as penicillins, cephalosporins, and carbapenem (Kuinkel *et al*.,2021).

Genes encoding resistance enzymes can be derived either from the bacterium itself or from Elements Mobile (EM), such as the plasmid encoding beta-lactamases or aminoglycoside-modifying enzymes (Shamina *et al*.,2020).

Klebsiella pneumoniae is also known for its capability to form biofilms, which are communities of bacteria embedded in an extracellular matrix. This matrix consists of proteins, exopolysaccharides, DNA, and lipopeptides (Flemming *et al*., 2022).

Molecular typing is vital for understanding the genetic links between different bacterial strains as well as identifying outbreaks and possible hospital-acquired infection origins. It is especially essential for hospital-acquired *K. pneumoniae* infections and for enhancing outbreak management. Though various techniques exist, randomly amplified polymeric DNA analysis(RAPD) is a simple, rapid, inexpensive, and widely used typing method that does not require advanced knowledge of the DNA sequences of the target organism. RAPD typing has been successfully employed for the epidemiological analysis of many bacteria (Saadatian *et al*.,2018). Enterobacterial repetitive intergenic consensus ERIC-PCR is effectively employed to genotype *K. pneumoniae* isolates from various origins, and it is considered one of the most efficient, comparatively easy, and cost-effective techniques (Mahmud *et al*.,2022).

Integrons are genetic elements that play a significant role in the transmission of multidrug resistance genes in several gram-negative bacteria. It is responsible for site-specific recombination of mobile gene cassettes (Jahanbin *et al.*,2020*).* Integrons contain an essential element: the gene *intI,* encoding an integron integrase (IntI), which catalyzes the excision and integration of the gene cassettes where the antibiotic resistance gene is located. The amino acid sequences of IntIs have been used to classify them into five classes, and classesI, II, and III have been implicated in the distribution of resistance genes (Malinga *et al*., 2022).

1.2.Aims of the study

Determining molecular diversity by different techniques: ERIC, RAPD-PCR, and integron detection of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates recovered from Baqubah hospitals. The following steps were used to implement the research:

1. Isolation of *Klebsiella pneumoniae* from patients attending Baqubah city hospitals and diagnosis by morphological, biochemical, Vitek 2-GN system, and 16S rRNA.
2. Identifying the widespread drug resistance patterns and multidrug resistance among the isolates.
3. Phenotypic detection of some virulence factors.
4. Detection of different classes of integron.
5. Determination of molecular diversity by different of a technique: ERIC , RAPD-PCR.

الخلاصة

الخـــلاصـــة

تعد بكتريا الكليبسيلا الرئوية (*Klebsiella pneumoniae*) سالبة لصبغة كرام تسبب اصابات صحية خطيرة ,مقاومة لمضادات حياتية مختلفة. تهدف هده الدراسةالى عزل بكتريا الـ *Klebsiella pneumoniae* من مرضى عراقيين وتنميطها جينيا باستخدام طرق الـ (Integrons I, II, III ,ERIC-PCR ,RAPD-PCR) وعلاقة دلك بمقاومتهم للمضادات الحياتية . قد تم جمع خمسون عزلة تعود لبكتريا الـ *Klebsiella pneumoniae* من مستشفيات مختلفة في مدينة بعقوبة تشمل مستشفى بعقوبة التعليمي ومستشفى البتول التعليمي. للفترة الممتدة من ايلول 2022 إلى كانون الثاني 2023. تم الحصول على هده العزلات من مصادر مختلفة تشمل: 23 (46٪) عزلة من الادرار ، 9 (18٪) عزلة من الحروق ، 2 (4٪) عزلة من مسحات الادن ، 5 (10٪)عزلة من الدم ، 3 (6٪) عزلة من القشع ، 6 (12٪)عزلة من الجروح , 2 (4٪) عزلة من السوائل. تم تحديد جميع عزلات *K. pneumoniae* اعتمادا على الصفات المظهرية والمجهرية والفحوصات الكيميائية حياتية وتم تاكيد التشخيص باستخدام نظام Vitek 2 Compact System و جينيا بوساطة 16S rRNA .

تم إجراء اختبار حساسية المضادات الحياتية تجاه 12 مضاد حياتي باستخدام طريقة نشر الأقراص (Kirby-Bauer-method) , اظهرت نتائج فحص الحساسية أن عزلات *K. pneumoniae* تمتلك مقاومة عالية تجاه معظم المضادات الحياتية قيد الدراسة و كانت نسبة المقاومة للعزلات المدروسة كما يلي: Ampicillin, 96 % , Amoxicillin/Clavulanic acid, 98 %, Cefotaxame Ceftazidime 96% Doxycycline 90%, Trimethoprim/Sulfamethoxazole, 80 % Tobramycin 52% , Amikacin , 48 %, Meropenem and Impenem 38 %, Levoflaxicin 46 % and Azethromycin 66% .

أظهر اختبار حساسية المضادات الحيوية لعزلات *K.pneumoniae* أن 2 (4٪) كانت (MDS)، 24 (48٪) كانت (MDR) ، 8 (16٪) كانت (XDR) ,16 (32٪) كانت (PDR) (للمضادات تحت الدراسة). عند اجراء الفحص المظهري للكشف عن *Klebsiella pneumoniae* المنتجة لانزيم البيتالاكتاميز للفئات الثلاث($ESBL,MBL,AMP^C$).بينت النتائج ان (66%)33 منتجة لانزيم البيالاكتميز واسعة الطيف و(34%)17 غير منتجة لهدا الانزيم. و لانزيم البيتالاكتام المعدنية (MBL) (70%)35 و (30%)15 غير منتجة لهدا الانزيم. بينما كانت منتجة لانزيم (AMP^C) Ambler class C beta-lactmase بنسبة (22%)11 منتجة و (78%)39 غير منتجة للانزيم.

اوضح الكشف المظهري للاغشية الحيوية لبكتريا *K.pneumoniae* باستخدام Micro-titer plate ان معدل تكون الاغشية الحيوية (38%)19 عزلة صنف على انه معتدل الانتاج و 12(24%) عزلة قوي , بينما 19(38%)غير مكون للاغشية الحيوية.

ERIC -PCR, تم دراسة 16 عزلة من صنف متعددالمقاومة للمضادات الحياتية باستخدام برايمرات خاصة اظهرت نتائج التضخيم باستخدام التعداد التكراري RAPD-PCR, IntegronIII ,IntegronII ,IntegronI كانت تحتوي عل الاقل حزمة واحدة او اثنين .كما قسمت 14(78%)عزلة ان ERIC-PCRللجراثيم المعوية تظهرانماطا متشابهة لمقاومة المضادات الحياتية داخل نفس B و A الى مجموعتين رئيسيتين ERIC -PCRنتائج المجموعة.

بناء على التحري عن جين Integrase للكشف عن وجود انتكرون الصنف الاول Class I Integron, اظهر اختبارPCR ان 16 عزلة (100%) من *K.pneumoniae* كانت ايجابية لجين Integrseمما يؤكد الانتشار العالي للغاية لانتكرون الصنف الاول Class 1 Integron في مستشفيات بعقوبة في محافظة ديالى.

يرتبط انتكرون الصنف الاول Class 1 Integron با لعديد من جينات المقاومة وتلعب دورا مهما في تطوير مقاومة المضادات الحياتية .وفقا للنتائج التي توصلنا اليها وجد ان العزلات التي تنتمي مجموعة النشوء والتطور B (Phylogenic B) كانت مقاومة 100% لجميع المضادات الحياتية قيد الدراسة . تليها مجموعة النشوء والتطور A (Phylogenic A), كانت مقاومة 100% لمضادات Cefotaxame, Ceftazidime Amoxillin –Clvanic, acid,Ampicillin. كانت نتائج الانتكرون الصنف الثاني Class II Integron ايجابية وبنسبة 1(6.25) عزلة من بكتريا *K.pneumoiae* .في حين كان نتائج انتكرون الصنف الثالث ClassIII Integron ايجابية لكل عزلات بكتريا *K.pneumoniae* (100%)16. كما كانت نتائج تضخيم جين RAPD للعزلات البكتريا 0% .

اظهر التحليل الوراثي لجين الرنا الرايبوسومي 16S باستخدام طريقة سنكر Nucleotide BLAST لدراسة التشابه التسلسلات في قاعدة NCBI, اظهرت وجود اثني عشر متغيرا من الحامض النووي موزعة في عينات من S1-S3 حيث لوحظ 410A>G,134C>T,408T>G في عينة S1 ولوحظ 826A>G في عينة S2 و 840A>G في عينة S3 في حين تم تحديد 426 G>T في كل من S1,S3 كما لوحظ Gdel841,Gdel782,900A>G, Gdel905,969A>G,971Adel. تم ايداع ثلاث من التتابعات الرايوسومية التي تم فحصها بارقام خاصة في بنك الجينات NCBI هي OQ826570, OQ826571, and OQ826572 رمز العزلات S1,S2,S3 على التوالي).