جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

كلية العلوم

قسم علوم الحياة

تاثير السبروفلوكساسين والريسفيراترول على تعبير جينات مضخات الدفق *AdeI , A deF, AdeJ* في بكتريا *Acintobacter baumannii* المعزولة من عينات دم

رسالة مقدمة الى

مجلس كلية العلوم – جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من قبل الطالبه

منتهى احمد عبد الكريم

بكالوريوس علوم حياة / جامعة ديالى (2008)

بإشراف

أ.د كريم إبراهيم مبارك

Republic of Iraq

Ministry of Higher Education and Scientific Research

University of Diyala

College of Science

Department of Biology

Effect of Ciprofloxacin and Resveratrol on expression of *AdeI*, *AdeF*, and *AdeJ* efflux pumps genes in *Acinetobacter baumannii* isolated from blood samples

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

Muntaha Ahmed Abdul –Kareem

B.Sc. Biology/ University of Diyala (2008)

Supervised by

Professor .Dr. Kareem Ibrahim Mubarak

2023 A.C **1445A.H**

Chapter One
Introduction

1. Introduction

Acinetobacter baumannii is agram negative, coccobacilli ,nonlactose fermenting, oxidase negative ,aerobic and human opportunistic extracellular pathogen originating from hospital acquired infections to be known also as a nosocomial infection. *Acinetobacter baumannii* also known as "Iraqibacter" due to its emergence in US military treatment facilities in Iraq, has quickly become one of the most troublesome pathogens for healthcare institutions globally and currently tops the priority pathogens list for development of new antibiotics (Chapartegui-Gonzalez *et al*., 2018; Nguyen and Joshi ., 2021).

Acinetobacter baumannii cause several diseases in different tissues and systems of patients include infections in bloodstream , urinary tract , eye and bacteremia specially when the patients stay for a long time with long periods combined with device use, other infections as meningitis ,intra-abdominal and surgical operation , respiratory tract and digestive system (Doi *et al.*, 2015 ; Nasr,2020)

Bacteria can stay in the intensive care unit (ICU) in hospital for month period because the organism has a number of virulence factors such as biofilms production , Lipopolysaccharides (LPS), vesicles and proteins, capsules , posses phospholipases, proteases enzymes, porins, and siderophors factor (Pakharukova *et al*., 2018; Lee *et al*.,2018). *A. baumannii* cause bloodstream infections in intensive care unit a among patients with central venous catheters, mechanical ventilation, pneumonia, drain use, and respiratory and cardiovascular failure pathogen are opportunistic (Guo *et al*., 2016; Mariana *et al* .,2020) . *A. baumannii* has been isolated from different clinical specimens from patients admitted hospital in the ICU . This result increased the morbidity, number of days of patient stay, and higher mortality ,bacterial species account for upto 2% of all bloodstream

infections and are commonly associated with intravascular devices. (Jawetz and Adelbergs, 2018).

Acinetobacter baumannii has emerged as a highly troublesome nosocomial pathogen around the world in recent decades. Especially in the last 15 years, it has a great ability to up regulate or acquire resistance determinants, making it one of the most successful organisms threatening the current antibiotic therapy, due to its ability to persist and spread through mucosal surfaces in hospital environments (Peleg *et al*., 2020). *A.baumannii* has become resistant to most effective antimicrobial agents and causing a high incidence rate of morbidity and mortality especially in the intensive care unit in many countries (Moulana *et al.*, 2020). The ability to gain multiple virulence factors, including resistance determinants such as serum resistance, efflux pumps and iron acquisition mechanisms, in addition to its ability to develop multidrug resistance and to survive in hospital environments for prolonged periods has helped it to emerge as a successful opportunistic nosocomial pathogen (Al-Kadmy *et al*., 2018).

Acinetobacterbaumannii and the emergence of isolates resistant to practically all known antibiotics are highly concerning (Peleg *et al*., 2020). Three decades ago traditional antibiotics effectively treated *A. baumannii* infections (Jale Moradi *et al*., 2015). But currently by contrast it has developed resistance to almost all critical antibiotic classes. As a result the emergence of multi-drug resistant (MDR), extensively-drug resistant (XDR) and pan-drug resistant (PDR) (Bardbari *et al*., 2020). *A bumannii* one of the most common and serious MDR species have been classified within the *"ESKAPE* group*" include Enterococcus faecium, S. aureus, K. pneumoniae, A. baumannii, P. aeruginosa and Enterobacter spp.* Several mechanisms contribute to *A. baumannii* strains' resistance, including the production of modifying enzymes, changes in cell membrane permeability, an

increase in the expression of efflux pumps, and genetic mutations in DNA gyrases and topoisomerases (Gheorghe *et al*., 2021).

The efflux pumps are the newest bacterial resistance mechanism considered the main cause for the evolution of antibiotic resistance of *A. baumannii* originated from hospital infection. Through the recent times because of the low absorbency of outer membrane drug efflux systems has become one of the most complex mechanism of antibiotics resistance and has played an essential role on drug resistance specially in *A. baumannii* (Hood *et al*.,2010) ,so that it would be useful to reduce of antibiotic resistance by this mechanism. Some molecules (chemical or natural) have the capacity to act specifically on the efflux system to restore the action of antibiotics and commonly called efflux pumps inhibitors (EPIs) (Cheesman *et al*.,2017).

Gene expression is the process by which information from a gene is used in the synthesis of a functional gene product. Bacterial gene expression depends not only on specific regulatory mechanisms but also on bacterial growth because important global parameters such as the abundance of RNA polymerases and ribosomes are all growth-rate dependent. The changes in gene expression often reflect changes in the environment. Understanding these global effects is necessary for a quantitative understanding of gene regulation and important physiological functions such as antibiotic resistance and tolerance (persistence) (Klumpp *et al* ., 2009).

Aims of study

Due to the scarcity of research on bloodstream infections by *A. baumanii* in intensive care unit of Baqubah Teachning Hospital . This study was proposed with the goal of investigating the presence of bacterial isolates in blood specimens by implementing the following steps:

1- Detection the antibiotic sensitivity testing and classification of the multi-drug resistance (MDR) isolates.

2- Detection of some virulence factors in diagnosed pathogens and investigate the relationship of some factors to antibiotics resistance.

3 - Molecular detection of some genes that coding efflux pumps in the isolates.

4- Detection the effect of some efflux pumps inhibitors on the quantitative gene expression for some genes that responsible for this mechanism of antibiotics resistance .

الخلاصة

جمعت مائتان وعشرة عينة دم من المرضى الراقدين في وحدة العناية المركزة (ICU) في مستشفى بعقوبة التعليمي للفترة من 1 /9 /2022 الى 30 /12 / 2022 ، وسجلت المعلومات عن المريض والتي شملت اسم المريض و العمر ونوع الإصابة المتعلقة بحالة المريض الراقد ، شخصت العزلات البكتيرية بناءً على الخصائص المظهرية للبكتريا والمستعمرات النامية والاختبارات البايوكيميائية الاساسية ، وتم تأكيد تشخيص عزلات البكتريا باستخدام جهاز الفايتك Vitek 2 compact system والتشخيص الجزيئي بالكشف عن الجين *bla- OXA51 gene*

كانت النسبة المئوية لعزلات الراكدة البومانيه المشخصة من مجموع عينات الدم للمرضى في وحدة العناية المركزة 25 (12 %) ، اذ توزعت العزلات على حالات مرضية متعددة بواقع : 4 (16 %) لكل من تسمم الدم المصاحب لالتهاب الحروق و الإصابات التنفسية و 3 (12 %) لكل من نزيف الدماغ والفشل الكلوي و 5 (20 %) لالتهاب الجروح ، 6 (24 %) لقرحة القدم السكري ، كما تبين من نتائج الدراسة أن جميع العزلات ابدت نسب عالية في مقاومة اربعة عشر من مضادات الحياة المستخدمة قيد الاختبار ، اذ كانت المقاومة للـ Cefotaxime (100%) ، Ticarcillin-clavulante وCeftriaxone (96%) بينما كانت لل Piperacillin-tazobactam وCefepime ، Tobramycin (92%) وأظهرت مقاومة منخفضة ل Doxycycline (64 %) . بلغت النسبة المئوية للمقاومة لخمسة وعشرون عزلة مشخصة : PDR 13 (52 %) ، MDR 8 (32%) و XDR 4 (16%). كشف تشخيص قدرة البكتريا في تكوين الأغشية الحيوية أن جميع العزلات لديها القدرة على تكوينها ، حيث اظهرت النتيجة ان 15(60 %) من عزلات *A. baumannii* قادرة على تكوين غشاء حيوي بدرجة قوية بينما 10(40 %) كونت غشاء حيوي بدرجة متوسطة . اوضح الكشف المظهري عن إنتاج مضخات الدفق أن جميع عزلات الراكدة البومانية 25(100%) أظهرت القدرة على الانتاج ماعدا عزلتين فقط (، A.b1، A.b 3) والتي أظهرت عدم قدرتهما على الانتاج في التراكيز الواطئة من الصبغة .

تبين من الدراسة الجزيئية بتقنية تفاعل سلسلة البوليمر (PCR) وجود جينات مضخات الدفق RND *AdeIJF* في كافة العزلات المستخدمة في الدراسة 18 (100) %. بينت دراسة التعبير لجينات مضخات الدفق *AdeIJF* لثلاث عزلات مقاومة عوملت بثلاث معاملات ciprofloxacin ، Resveratrol ، ومزيجهما وجود زيادة في التعبير للجين *adeI* حيث أن متوسط الطي folding (1.35) بعد المعاملة بالسيبروفلوكساسين نتج عنه جهد

ملحوظ للبكتيريا للبقاء والنمو ، بينما ظهر انخفاض في التعبير عن *adeI* لمستوى منخفض من الطي بعد المعاملة بالريسفيراترول 0.59 والمزيج 0.79 . كما أظهرت النتائج أن الطي أظهر انخفاضً في قيم التعبير للجين *adeF* بعد المعاملة بـال Ciprofloxacin و Resveratrol ومزيجهما لكل من عزلات *A. baumannii* الثلاثة المقاومة اذ كانت تساوي 0.76 ، 0.50 ، 0.93 على التوالي . كانت قيم معدل الطي للجين *adeJ* بعد المعاملة بالسبروفلوكساسين ،و الريسفيراترول ، ومزيجهما 0.28 ، 0.43 ، 1.57 على التوالي ، أظهر التحليل الإحصائي فروق معنوية عند المقارنة بين التعبير لهذه الجينات في العزلات المعاملة وغير المعاملة .اذ بلغت 0.033 , 045 , 0.043 على التوالي عند مستوى المعنوية 0.05 .

يشير الانخفاض في التعبير للجينات(*AdeIFJ*) بعد معاملة البكتيريا باستخدام الريسفيراترول إلى وجود نتائج واعدة بامكانية استخدامه كواحدة من المواد الطبيعية (من المستخلصات النباتية) كمثبط لمضخات الدفق وتحقيق زيادة حساسية البكتيريا لمضادات الحياة .