



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



دراسة جزيئية لعوامل الضراوة في بعض عزلات البكتريا الممرضة للمجاري البولية ودراسة تأثير الكولجسين على تكوين الغشاء الحيوي

رسالة مقدمة الى
مجلس كلية العلوم – جامعة ديالى
وهي جزء من متطلبات نيل درجة
الماجستير في علوم الحياة

من قبل الطالبة
منار عبد الكريم محمد
بكالوريوس علوم الحياة / جامعة ديالى (2010)
بإشراف

أ . د . زينب محمد نصيف الزبيدي أ . د . خزعل ضبع وادي

2023 م

1445 هـ



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



Molecular study of virulence factors of some uropathogenic bacterial isolates and study the effect of colchicine on biofilm formation

A thesis submitted to the College of Science, University
of Diyala in partial fulfillment of the requirements for the
Master Degree in Biology

By

Manar Abdulkarim Mohammed

B.S.C Biology/ College of Science/ University of Diyala 2010

Supervised By

**Prof. Dr. Zainab Muhammed Nsaif
Wadi**

prof.Dr. Khazal Dh.

2023 A.D

1445 A.H



Chapter One

Introduction

1. Introduction

Enterobacteriaceae family contains has a large number of genera that are biochemically and genetically related to one another. This group of organisms includes several that cause primary infections of the human gastrointestinal tract. Members of this family are major causes of opportunistic infection including urinary tract infections. Urinary tract infections (UTIs) are one of the most common pathological conditions in both community and hospital settings. It has been estimated that about 150 million people worldwide develop UTI each year, with high social costs in terms of hospitalizations and medical expenses. family Enterobacteriaceae and other pathogens are major public health issue with a significant financial cost (Bonkat *et al.* 2017). Urinary tract infections are main Caused by are Gram-negative bacilli including *Klebsiella pneumoniae* which is a common opportunistic pathogen that frequently causes nosocomial infections, including pneumonia, meningitis, bloodstream and urinary tract infection(Ku *et al.* 2017; Russo and Marr 2019). An unique case of *K. pneumoniae* caused liver abscess along with endophthalmitis was reported for the first time in Taiwan in the 1980s, and the causative organism was designated as hypervirulent *K. pneumoniae* (hvKP) (Liu *et al.*, 1986). Since then, hvKP has been recognized as another circulating pathotype in addition to classical *K. pneumoniae* (cKP), associated with high pathogenicity and mortality due to hypervirulence (Lan *et al.* 2020). Factors contributing to the hypervirulence mainly include capsule, siderophores, lipopolysaccharide (LPS) and fimbriae (Parrott *et al.* 2021). multidrug-resistant and hypervirulent (MDR-hv) strains have recently emerged, primarily due to horizontal transfer of plasmid-mediated resistance or virulence(Liu *et al.* 2020; Tang *et al.* 2020). The spread of hvKP, including MDR-hvKP strains, poses a serious threat to the public health, and studies on hvKP virulence are therefore imperative to

comprehend the underlying pathogenesis and provide a theoretical basis for the treatment and prevention of infection. Opportunistic pathogen responsible for a variety of community and hospital infections caused by carbapenem –resistant *K. pneumoniae* (CRKP) constitute a major threat for public health and are strongly associated with high rates of mortality, especially in immunocompromised and critically ill patients (Karampatakis, Tsergouli, and Behzadi 2023).

The pathogen *K. pneumoniae* has become more resistant, limiting therapy choices. When compared to community-acquired urinary tract infections, virulence and multi-drug resistance for nosocomial urinary system *K. pneumoniae* infections are linked to community-acquired isolates(Caneiras *et al.* 2019). Virulence *K. pneumoniae* is providing by a wide array of factors that can lead to infection and antibiotic resistance, these bacteria may be identified by their production of β -lactamase, resistance to β -lactam drugs, presence of a lipopolysaccharide, and a capsule that is phagocytosis-resistant. Because of their resistance to phagocytosis and death due to humoral and cellular defense, these bacteria create biofilm, which was a significant role in the development of chronic infections(El-Mokhtar *et al.* 2020).

Among the other common uropathogens associated to UTIs development, UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) is the primary cause. UPEC strains possess a plethora of both structural (as fimbriae, pili, curli, flagella) and secreted (toxins, iron-acquisition systems) virulence factors that contribute to their capacity to cause disease, although the ability to adhere to host epithelial cells in the urinary tract represents the most important determinant of pathogenicity. On the opposite side, the bladder epithelium shows a multifaceted array of host defenses including the urine flow and the secretion of antimicrobial substances, which

represent useful tools to counteract bacterial infections. The fascinating and intricate dynamics between these players determine a complex interaction system that needs to be revealed. The efficacy of antibiotic treatment depends on the identification and antimicrobial resistance pattern of uropathogens responsible for UTI (Bartoletti *et al.* 2016). The practice of prescribing antibiotics to treat UTI without bacterial characterization led to increased resistance among uropathogens and to decreased effectiveness of oral therapies. Despite clinical symptoms of UTIs have been ameliorated by numerous antibiotics, UPEC persistence and resistance to antibiotics represent a serious problem (Blango and Mulvey 2010). According to the 2015 guidelines of the European Association of Urology, the recommendations for the prevention of recurrent UTI are first aimed at behavioral changes and immediately after toward non antibiotic measures. If these two recommendations are not sufficiently effective then the antibiotic prophylaxis should be considered, in order to prevent the adverse events and collateral damages that the long-term and not necessary use of antibiotics may cause (Vahlensieck *et al.* 2016).

Antibiotics will continue to be an unavoidable source for the prevention of UTIs on a case-by-case basis. However, the excessive use of antibiotics and the long-term interference with intestinal microbiota, require to search for alternative remedies. A plethora of molecules has been tested to reduce UPEC infections by exploiting their ability either to stimulate the immune system or to interfere with the UPEC ability to adhere and invade the urothelium. Here we briefly summarize the most effective alternative remedies to fight UP (Korbel *et al.* 2017).

Among the common uropathogens associated to UTIs development, Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) is the primary cause. UPEC strains possess a plethora of both structural (as fimbriae, pili, curli, flagella) and secreted (toxins, iron-acquisition systems) virulence factors that contribute to their capacity to cause disease. Both Gram-negative and Gram-positive bacteria as well as fungi are responsible for UTIs. Among Gram-negative bacterial agent, followed by uropathogenic *E. coli* (UPEC) is the most common causative agent, followed by uropathogenic *K. pneumonia* (UPKP) (Behzadi *et al.* 2023).

There are many generations of antibiotics were discovered, from these antibiotics known as carbapenems are types of highly effective antibacterial agents that used exclusively to treat intractable or MDR-bacterial infections). Carbapenems belong to the beta-lactam class of antibacterial agents and the group appeared high resistance to these antibiotics called Carbapenem resistance- Enterobacteriaceae (CRE), this group are detected and reported around the world. Antibiotics will continue to be an unavoidable source for the prevention of UTIs on a case-by-case basis. However, the excessive use of antibiotics and the long-term interference with intestinal microbiota, require to search for alternative remedies. A plethora of molecules has been tested to reduce UPEC infections by exploiting their ability either to stimulate the immune system or to interfere with the UPEC ability to adhere and invade the urothelium.

Several studies report the antibacterial activity of plant extracts, particularly in *in vitro* studies (Lüthje and Brauner 2016). The infections caused are more difficult to treat with a few options available to treat bacterial infections; there are some phytochemical remain the most active

الخلاصة

أجريت دراسة حالة ضابطة في مستشفيات بعقوبة والبتول التعليمية خلال الفترة الممتدة من نوفمبر 2022 إلى فبراير 2023. تم جمع ما مجموعه 300 عينة بول من المرضى الذين تم تشخيصهم سريريا بمرض التهاب المسالك البولية من قبل الأطباء. تعد *Escherichia coli* و *Klebsiella pneumoniae* من العوامل الرئيسية المسببة لعدوى المسالك البولية ، فهي شديدة المقاومة للمضادات الحيوية بسبب عوامل الفوعة العديدة التي تمكنها من التسبب في التهاب المسالك البولية وحتى الحالات الشديدة والمزمنة من العدوى. تم عزل ما مجموعه 30 (*klebsiella pneumoniae* (%13.6) و 13 (*Escherichia coli* (%5.9) من الإيشريشيا القولونية المسببة للأمراض المسببة للأمراض وتم تحديدها على أنها شديدة الفوعة ومقاومة للأدوية المتعددة. معظم k. التهاب الرئوي والإيشريشيا القولونية. تم عزل 127 (58.3%) من الإناث و 125 (41.6%) من الذكور ، تتراوح أعمارهم من أقل من 8 أشهر إلى 32 شهرًا. تم استخدام Hi chromo agar لتمييز K. الرئوية و *E. coli* عن بقية عزلات *enterobacteriaceae*.

تم استخدام الاختبارات البيوكيميائية ونظام Vitek 2 Compact لتأكيد التشخيص النهائي. تم عزل (% *E. coli* 13 (5.9) و *K. pneumoniae* 30 (13.6%) من K.

تناولت نتائج الدراسة الحالية دراسة بعض عوامل الضراوة ظاهريا بالطرق الاستزراعية في *E. coli* و *K. pneumoniae*. الهيموليسين ، الكبسولة ، اليورياز ، الحركة ، حاملات الحديد ، البروتياز ، وتشكيل الأغشية الحيوية. بالنسبة لعزلات الإيشريشيا القولونية ، أظهرت النتائج أن 13 (100%) كانت عبارة عن غشاء حيوي قوي سابق ، متحرك ، و Siderophores ، و 92% و (76.9%) من عزلات *E. coli* لديها القدرة على إنتاج إنزيم البروتياز ولها كبسولة على التوالي ، بينما قدرة UPEC على إنتاج الهيموليسين وجد أن 8 (75%) من العزلات كانت قادرة على تحليل خلايا الدم الحمراء في حين أن 5 (25%) الباقية لم تكن كذلك ، وكذلك جميع العزلات غير المنتجة (0%). ليورياز و جيلاتيناز و تجلط الدم.

وفقا للنتائج الحالية. تم اختبار إجمالي 13 عزلة من بكتريا *E. coli* على 12 نوعا من المضادات الحيوية باستخدام طريقة الانتشار القرصي ، وأظهرت النتائج مقاومة للمضادات الحيوية المتعددة. تعطي العزلات أعلى معدل مقاومة 100% ضد سيفوتاكسيم ، سيفترياكسون ، سيبروفلوكساسين ، تريميثوبريم - سلفاميثوكسازول. و ؛ كانت أقل نسبة المقاومة 15.4% ضد ميروبيينيم .

اختبرت العزلات من أجل إنتاج إنزيم ESBL باستخدام اختبار تآزر القرص المزدوج (DDST) ، وأظهرت النتائج أن 9 عزلات (69.2%) كانت منتجة لـ ESBL بينما 4 (30.7%) عزلات لم تنتج الإنزيم. أظهرت جميع العزلات في الدراسة مستوى مقاومة للأدوية المتعددة (MDR، XDR) للمضادات الحيوية المختبرة بنسبة 100%. والتي كانت 5 (38.4%) من العزلات عبارة عن MDR عند مقاومة مضاد حيوي واحد على الأقل مرتبط بواحدة من ثلاث مجموعات من المضادات الحيوية والباقي 8 (61.5%) كانت XDR التي قاومت المضادات الحيوية لأكثر من أربع أو خمس مجموعات من المضادات الحيوية المختلفة. أظهرت النتائج أن العزلات E36 و E43 وجدت مقاومة لـ 7 مضادات حيوية. تم العثور على العزلات E38 و E41 و E42 لتكون مقاومة لثمانية مضادات حيوية. تم العثور على العزلات E34 و E35 و E37 مقاومة لـ 9 مجموعات من المضادات الحيوية لكل منها. أظهر عزل E33 مقاومة تجاه 10 مجموعات من المضادات الحيوية. وجد أن عزلات E31 و E32 و E39 و E40 مقاومة لأكثر عدد من مجموعات المضادات الحيوية ، حيث تقاوم 11 مجموعة

تم استخدام PCR للكشف عن جينات *fimH* و *kpsMII* و *bla-TEM* ، وكان حجم منتجاتها 465 نقطة أساس و 668 نقطة أساس و 1080 نقطة أساس على التوالي ، وتم فحصها باستخدام PCR أحادي ، وكانت جميع العزلات تحتوي على 100% *fimH* ، وتم العثور على *kpsMII* في (53%) و *bla-TEM* (61%).

من ناحية أخرى ، أظهرت نتائج الكشف عن بعض عوامل الضراوة 30 (13.6%) عزلة من بكتيريا *K. pneumoniae* أن إنتاج الهيموليسين قد تم اختباره باستخدام أجار دم الأغنام ووجد أن جميع عزلات *K.* قادرة على انحلال الدم الأحمر. كما تم فحص إنتاج الكبسولة باستخدام صبغة النيجروسين متنوعة بالفحص المجهرى المباشر ووجد أن 28 (93.3%) من عزلات *K.* الرئوية كانت محاطة بكبسولة بالإضافة إلى (100%) من مكونات الأغشية الحيوية. 86.6% ، 77% و 70% من العزلات كانت حاملاً حديد ، البروتين و coagulase أعطت نتائج إيجابية على التوالي. تم اختبار إنتاج البيوفيلم باستخدام طرق: طريقة الصفائح الدقيقة (MTP) ، وأظهرت النتائج أن 16 (53%) من *K.* الرئوية كانت عزلات سابقة للغشاء الحيوي.

تم إجراء مقاومة للمضادات الحيوية لاختبار 30 (13.6%) من عزلات *K.* الرئوية وأوضحت النتائج أن أعلى المقاومة تجاه ticarcillin-clavulante و cefotaxime و ceftriaxone و ciprofloxacin كانت 100%. بينما كانت أقل نسبة مقاومة للميروبيينيم .

كما تم حساب أنماط المقاومة للعزلات *K. pneumoniae* وكانت 16 عزلة (53%) من MDR والتي تشمل عزلات قاومت ثلاث مجموعات من المضادات الحيوية و 14 (47%) كانت XDR التي قاومت أربع أو خمس مجموعات من المضادات الحيوية المختلفة. تم قياس الحد الأدنى للتركيز المثبط لجميع عزلات *K. pneumoniae* باستخدام السيفتازيديم والسيفيبيم على أجار مولر-هينتون وتم تحضير التخفيفات التسلسلية وكانت النتائج 512 و 1024 ميكروغرام / مل على التوالي.

تم اختبار إنتاج ESBL أيضًا باستخدام اختبار تآزر القرص المزدوج وكان 18 (60%) عزلة من *K. pneumoniae* منتجة بينما لم يتم إنتاج 12 (40%) منها.

تم إجراء الكشف الجزيئي للكشف عن بعض جينات الفوعة في *K. pneumoniae*. تم استخدام تفاعل البلمرة المتسلسل للكشف عن جين الالتصاق *fimH* في *K. pneumoniae* ، وأظهرت النتائج أن 75% من *k* تحتوي عزلات *pneumoniae* على جين *fimH* و *rmpA* المسئول عن تكوين الكبسولة ووجد في 66% (*K. pneumoniae* المعزولة ، طبقًا لتفسير الجين *bla-TEM* ESBL ، 71.2%) كان لعزلات *K. pneumoniae* جين *bla-TEM*.

كشفت الدراسة الحالية لأول مرة في العراق عن استخدام عقار الكولجيسين القلوي الكيميائي. تم تحضير ثلاث تراكيز مختلفة للكشف عن النشاط المضاد للبكتيريا للكولجيسين (0.02، 0.01 و 0.3 جم / لتر) مقابل نمو خمسة (لكل بكتيريا) تم اختيارها من مجموع فرط الفوعة *E. coli* و *K. pneumoniae* ، وأظهرت النتائج. 0.03 جم / لتر كانت الأكثر فعالية من الأخرى (0.01 و 0.02 جم / لتر) وتراوحت منطقة التثبيط بين (12-12.4 مم) و (12-13.2 مم) للإشريشيا القولونية و *K. pneumoniae* الرئوية على التوالي.

تركيبية قلويد الكولجيسين تؤثر بشكل كبير على البقاء وتنشط بشدة تكوين الغشاء الحيوي وكانت نسبة التثبيط 80-89% عند التركيز 0.03 جم / لتر للإشريشيا القولونية و 8-5-90% للبكتيريا الرئوية