جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

كلية العلوم

قسم علوم الحياة

التنميط الجزيئي وانتشار اصناف الانتكرون في بكتريا الراكدة البومانية متعددة المقاومة للمضادات الحياتية

رسالة مقدمة إلى مجلس كلية العلوم– جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة

من قبل الطالبة

نور نبيل يونس

بكالوريوس علوم الحياة / كلية العلوم/ جامعة ديالى (2020)

إشراف

ا.م.د .لينا عبد الامير سلمان السعدي

1445هـ **2023 م**

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

Molecular Typing and Prevalence of Integron Classes in Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*

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

Noor Nabeel Younis

B.Sc. Biology/ University of Diyala (2020)

Supervised by

Assist. Prof. Dr. Lina Abdulameer Salman Alsaadi

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

Chapter One: Introduction

1.Introduction

The emergence of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* has become a significant concern in healthcare settings worldwide. Iraq is no exception, with an increasing incidence of *Acinetobacter baumannii* infections in recent years.

Al-Rubaie and Abbas, (2023) report that *A. baumannii* is a frequently encountered microorganism in healthcare settings, particularly in intensive care units (ICUs), where it can cause a range of infections, including septicemia, pneumonia, nosocomial meningitis, wound infections, urinary tract infections, and skin infections, among other illnesses.

The resistance of *A. baumannii* to antibiotics is caused by both intrinsic and acquired mechanisms, which are facilitated, in part, by genomic plasticity and adaptation, including the presence of mobile genetic elements (Pagano *et al*., 2016). One of the primary mechanisms of antibiotic resistance in *A. baumannii* is the production of β-lactamase enzymes, whose genes are typically located on mobile genetic elements such as integrons (Leungtongkam *et al*., 2018).

Integrons are genetic elements that can move between different bacteria and carry various genes that confer resistance to antibiotics, heavy metals, and antiseptics. Five classes of integrons are distinguished based on the conserved segments of the intI gene at the 5’ end. Integrons consist of an integrase encoded by the intI gene, a recombination site known as attI, and a promoter gene present in all integrons. Cassette genes are open-reading frames without promoters that contain antibiotic-resistant genes, and they can integrate into integrons via site-specific recombination. *A. baumannii* typically expresses Class 1 integrons, which play a significant role in antibiotic resistance and commonly contain genes that confer resistance to aminoglycosides, β-lactamases, Metallo-β-lactamases, and oxacillinases (Ghazalibina *et al*., 2019;Ashouri *et al*., 2022).

The development of antimicrobial resistance in *A.baumannii* is associated with its genome plasticity, which allows the acquisition of functional genetic determinants such as antimicrobial resistance and virulence genes that enhance its survival. The genomic characteristics of *A. baumannii* have become an intriguing area of research in understanding the epidemiology and evolutionary trajectories of this pathogen. Several studies investigating the genomic features of clinical isolates have indicated that *A. baumannii* possesses a large proportion of accessory genome comprising flexible gene pools that rapidly evolve through environmental selective pressure, resulting in the dynamic genome reorganization and intra-clonal diversity (Wiradiputra *et al*., 2023).

To conduct epidemiological research, evaluate microbial community population structures, and assess species genetic diversity, molecular typing techniques are commonly employed to identify infectious agents. Bacterial molecular typing plays a crucial role in preventing and controlling infections (Meshkat *et al*., 2017). In differentiating isolates of pathogenic microorganisms, the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR) technique has helped generate fingerprints and is considered an effective tool (Fukatsu *et al*., 2022).

The aims of the study

The aim of this study was to investigate extensively drug-resistant *A. baumannii* isolated from clinical samples of Iraqi patients in Diyala. The investigation involved molecular typing using the Arbitrarily primed PCR (AP-PCR) technique, detection of biofilm production, Metallo beta-lactamase production, and detection of integron classes genes responsible for antibiotic resistance using the PCR technique. The following steps were undertaken for this purpose:

1. Isolation and identification of *A. baumannii* from various clinical infections.
2. Assessment of multi-drug resistant phenotypes (MDR, XDR and PDR) and antibiotic susceptibility profiles in *A. baumannii* isolates.
3. Phenotypic detection of biofilm formation and metallo beta-lactamase (MBLs) enzymes.
4. Molecular detection of integron classes (1, 2, 3) responsible for antibiotic resistance using PCR technique.
5. Typing clinical isolates of *A.baumannii* using the AP-PCR technique.
6. Identification of bacterial species and diversity using molecular diagnostic methods such as 16S rRNA gene Sanger and Miseq sequencing methods.
7. Use of bioinformatics methods to analyze sequencing results and compile sequencing data to build tree genetics.

These steps were carried out to understand better the prevalence and molecular characteristics of extensively drug-resistant *A. baumannii* in Diyala, Iraq.

الخلاصة

الخـــلاصـــة

ان انتشار بكتريا الـ *Acinetobacter baumannii* المقاومة بشكل واسع للمضادات (XDR) اظهر قلق كبير في المستشفيات على الصعيدين العالمي والمحلي، اذ ترتبط هذه البكتيريا عادة بالعدوى المكتسبة في المستشفيات على مستوى العالم. اذ يواجه العراق حالة مماثلة، وقد تزايدت مؤخرًا حالات العدوى بـبكتريا الراكدة البومانية شديدة المقاومة.

تم جمع 200 عينة سريرية من المرضى المراجعين لمستشفيات مختلفة في محافظة ديالى بين أكتوبر 2022 وفبراير 2023. شملت هذه العينات عينات من حروق وجروح وبلغم وعدوى البول. أظهرت نتائج الدراسة أن العزلات البكتيرية ظهرت في 166 من هذه العينات ، بينما اظهرت 34 عينة نتائج سلبية. أظهر الكشف باستخدام الطرق الميكروبيولوجية التقليدية ونظام التشخيص VITEK 30 عزلة منها والتي تمثل 18% من الإجمالي، على أنها عزلات تعود لبكتيريا الـ *Acinetobacter baumannii*. كانت النسبة الاعلى لانتشار العزلات في الجروح، اذ بلغت 12 من أصل 30 عزلة (40%)، تليها الحروق بـ 8 من أصل 30 عزلة (26.7%)، ثم البلغم بـ 6 من أصل 30 عزلة (20%)، وأخيرًا عدوى البول بـ 4 من أصل 30 عزلة (13.3%).

لوحظ أن جميع عزلات الـ *A. baumannii* كانت مقاومة للمضادات الحيوية التالية الـ : Piperacillin، Ceftazidime، Cefepime، Cefotaxime، Ceftriaxone، Ampicillin–sulbactam، Piperacillin–tazobactam، Ticarcillin–clavulanic acid، و Gentamicin، بنسبة مقاومة قدرها 100%. على النقيض من ذلك، كانت نسب المقاومة للمضادات الحيوية الأخرى كالتالي :Amikacin (96.7%) ، Imipenem و Meropenem (76.7%)، Levofloxacin (66.7%)، و Ciprofloxacin (63.3%) . صنفت الثلاثين عزلة لـ *A. baumannii* إلى نمطين متميزين استنادًا إلى قابلية مقاومة المضادات الحيوية. على وجه التحديد، تم تصنيف 11 من أصل 30 عزلة (36.7%) كعزلات متعددة المقاومة للمضادات الحيوية(MDR) ، بينما تم تصنيف 19 من أصل 30 عزلة (63.3%) كعزلات مقاومة بشكل واسع للمضادات الحيوية (XDR).

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أنه من بين 30 عزلة من الـ *A. baumannii* ، تم تصنيف 16 (53.3%) عزلة على أنها غير مكونة للغشاء الحيوي ، في حين صنفت 14 عزلة المتبقية وبنسبة (46.7%) على أنها مكونة للغشاء الحيوي عند اختبارها باستخدام طريقة الكونغو الحمراء (Congo red). بالإضافة إلى ذلك، كشفت الدراسة باستخدام الفحص الكمي للكشف عن تكون الأغشية الحيوية باستخدام قارئ ELISA لحساب كمية الأغشية الحيوية أن 19 من أصل 30 عزلة تم تصنيفها على

أنها سلالات معتدلة في تكوين الغشاء الحيوي ، و 8 من أصل 30 عزلة صنفت على أنها عزلات ضعيفة في تكوين الغشاء الحيوي. علاوة على ذلك، تم تصنيف 3 من أصل 30 عزلة انها قوية في تكوين الغشاء الحيوي. اظهرت الدراسة أنه من بين 30 عزلة من الـ *A. baumannii* 13 منها وبنسبة (43.3%) اظهرت نتائج إيجابية لاختبار انزيمات البيتالاكتاميز المعدنية (metallo beta-lactamase) ، في حين أن 17عزلة وبنسبة (56.7%) أظهرت نتائج سلبية لهذا الإنزيم.

تم استخدام جين الـ *bla* $_{\text{OXA-51}}$ لتحديد عزلات الـ *A. baumannii* ، وتم اكتشافه في جميع العزلات الـ 19 من عزلات XDR *A. baumannii* التي تم دراستهاجزيئياً . اذ يعتبر هذا الجين تأكيدًا نهائيًا لتشخيص وتحديد عزلات الـ *A. baumannii* .

تم استخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) للتحري عن وجود الجينات المشفرة لـ *intI1*، *intI2*، *intI3*، والمناطق المتغيرة (CS). أظهر اختبار PCR أن 19 عزلة(100٪) من عزلات بكتريا *A. baumannii* الشديدة المقاومة للمضادات (XDR) تمتلك انتكرون الصنف الاول (Class I integron) ، 10 عزلات بنسبة 52.63% من اصل 19 عزلة شديدة المقاومة *A. baumannii* تمتلك الانتكرون الصنف الثاني(Class II integron) و 16 عزلة (84.21%) من عزلات *A. baumannii* شديدة المقاومة تمتلك الانتكرون الصنف الثالث (Class III integron). وبينت النتائج الحالية أيضًا أن 14 عزلة تحمل انتكرون الصنف الاول بحجم 750 زوج قاعدي , ثلاث عزلات بحجم 2500 زوج قاعدي وعزلتان بحجم3000 زوج قاعدي. باستخدام تقنية تحديد تسلسل النيوكليوتيدات اظهرت النتائج وجود تنوع في الجينات المحمولة على المناطق المتغايرة للانتكرون تضمنت *AadB, TrpA, Accd, aadA1* and *aadA2* . مما يؤكد الانتشار العالي للغاية للانتكرون الصنف الاول class (1) integron وارتباطه الوثيق بمقاومة المضادات الحيوية لهذه العزلات من *A.baumannii*.

اظهرت نتائج التحري عن التباين الوراثي لـ 19 عزلة من عزلات *A. baumannii* شديدة المقاومة للمضادات الحيوية بتقنية البصمة الوراثية AP-PCR ظهور 14 حزمة ذات أوزان جزيئية تتراوح بين (300-4000)زوج قاعدي. أظهرالتنميط الجيني بتقنية AP-PCR ان من مجموع 19 XDR-*A.baumannii* ظهور 13 نسيلة مختلفة بنسبة تشابه 90٪ تتضمن 6 مجموعات من الأنماط الجينية و7 عزلات فريدة..

تضمنت الدراسة الحالية استخدام مجموعة من ثمانية عزلات معينة بالأحرف الـ (S1 - S8) من *A. baumannii* المقاومة بشكل واسع للمضادات الحيوية في مدينة بعقوبة بمحافظة ديالى. أظهرت تفاعلات التسلسل النيوكليوتيدي التي تم إجراؤها لـجين 16S rRNA amplicons إلى

الهوية الدقيقة للعينات التي تم فحصها، والتي وجد أنها تعزى إلى *A. baumannii*. أظهر تحليل تسلسل الأحماض النووية للعينات الثمانية وجود أربعة متغايرات نووية موزعة في عينات الـ (S1 - S8). تحديدًا، تم اكتشاف النمط (81C>T) في عينات S1-S3 وS5-S8، في حين تم ظهور النمط (197C>T) في جميع العينات. علاوة على ذلك، تم تحديد النمطين (446C>T) و (461G>A) في عينات S1 ، S2، S4، S5، وS6. تم تسجيل هذه السلالات في المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (NCBI)، وتم الحصول على أرقام تسلسلية لجميع التسلسلات المحللة. تم تعيين رقم وصول لكل تسلسل وفقًا للآتي: OQ996976 ، OQ996977، OQ996978، OQ996979، OQ996980، OQ996981، OQ996982، وOQ996983، وهذه تمثل العينات S1 ، S2، S3، S4، S5، S6، S7، و S8على التوالي.