



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

التحري الجزيئي عن بعض جينات البيتالاكتاميز في بكتريا

Klebsiella pneumoniae ذات المقاومة الواسعة النطاق للأدوية

والمعزولة سريريا

رسالة مقدمة

إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى وهي جزء من متطلبات نيل درجة
الماجستير في علوم الحياة

من الطالبة

زينب محمد طه العزي

بكالوريوس علوم حياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى 2019

بإشراف

أ.د. صبا جاسم جواد الزبيدي

**Ministry of Higher Education and
Scientific Research
University of Diyala
College of Education for Pure
Sciences
Department of Biology**



**Molecular investigation of some beta-lactamase genes in
clinically isolated extensively drug resistant *Klebsiella
pneumoniae***

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 Master
Degree in Biology**

By

Zainab Muhammad Taha Al-Ezzi

B.Sc. Biology-College of Education for Pure Sciences 2019

Supervised by

Prof.Dr. Saba Jasim Jawad Al-Zubaidi

2024 A.D

1446 A.H

1. المقدمة Introduction

تُعد بكتيريا *Klebsiella pneumoniae* من أهم أنواع جنس *Klebsiella* وتعود إلى العائلة المعوية (Enterobacteriaceae) سالبة الكرام أحد مسببات الأمراض الانتهازية Opportunistic، تتركز في الجهاز الهضمي وقليل في البلعوم الأنفي، يمكن لبكتيريا *K.pneumoniae* أن تدخل الدورة الدموية أو الأنسجة الأخرى ثم تسبب العدوى قد تلتصق وتهاجم الخلايا الظهارية في الجهاز التنفسي العلوي يليها استعمار الأغشية المخاطية لا سيما المرضى الذين يعانون من داء السكري ونقص المناعة (Assoni وآخرون، 2024). تعد *K.pneumoniae* ثاني مسبب بعد *Escherichia coli* للالتهاب المسالك البولية وأحد مسببات الأمراض للالتهاب الرئوي المكتسب من المجتمع Community-Acquired Pneumonia (CAP) وخاصة في مرضى السكر ومدمني الكحول، وأصبحت سبباً رئيساً للعدوى في المستشفيات Nosocomial infection وعامل خطر للعدوى الشديدة المكتسبة من المجتمع CAP (Cillóniz وآخرون، 2019).

شكلت *K. pneumoniae* في الصين نسبة 11.9% من مسببات الأمراض المعزولة من الالتهاب الرئوي Pneumonia المرتبط بجهاز التنفس الصناعي Ventilator-Associated Pneumonia (VAP) والالتهاب الرئوي المكتسب بوحدة العناية المركزة Intensive Care Unit (ICU) (Zheng وآخرون، 2018).

تحتوي *K. pneumoniae* على العديد من عوامل الضراوة التي تسهل قدرتها على الانتشار والتهرب من الجهاز المناعي في الجسم والتسبب بأمراض للمضيف البشري ومنها المحفظة Capsule المسؤولة عن القوام المخاطي اللامع على سطح الوسط الزراعي الماكونكي والتي تعمل

على تثبيط عملية البلعمة Phagocytosis وتمنع ارتباط المتمم مع غشاء الخلية البكتيرية والاهداب Fimbriae التي تساعد على الالتصاق بالأسطح المخاطية والانسجة (Dorman وآخرون، 2018). وتحتوي *K. pneumoniae* على العديد من جينات عوامل الضراوة المحمولة على الكروموسومات و البلازميدات التي تجعلها مقاومة للعديد من المضادات الحيوية ومن أهمها جينات البيتا لكتاميز β -Lactamase (الواسعة الطيف Extended Spectrum β -Lactamase (ESBLs) ، والمعدنية Metallo β -Lactamase (MBL) و-Ampicillinase Class C β (Lactamase AmpC).

وفقاً للجينوم الإضافي Accessory genome يتم تقسيم سلالات *K.pneumoniae* على ثلاثة أنواع : انتهازية Opportunistic ومفرطة الضراوة Hyper-virulent (HV) و مقاومة للأدوية المتعددة Multidrug-resistant (MDR) (Martin و Bachman، 2018). إن مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية إما تكون ذاتية طبيعية Natural أو مكتسبة Acquired، لكن زادت المقاومة لبعض أنواع البكتيريا من أجل التكيف البيئي من خلال تعديل الجينوم الخاص بها عن طريق الطفرات أو النقل الأفقي للجينات (Horizontal gene transfer (HGT) (Bonev و Brown، 2019).

إن التطور العلمي في مجال التقنيات وأجهزة التشخيص الجزيئي للبكتيريا تعطي نتائج إيجابية وسريعة في تشخيص العديد من جينات المقاومة والطفرات المسببة للعديد من الأمراض منها تقنية تسلسل الجينوم الكامل Whole Genome Sequence (WGS) الذي أحدث ثورة في علم الأحياء المجهرية الطبية وأدى إلى انتقال تشخيص المقاومة والتنبؤ بها من النمط الظاهري إلى النمط الجيني (Avershina وآخرون، 2023).

تشير الدراسات الحديثة والمتعلقة بانتشار الأمراض والوبئة أن السلالات التابعة لبكتيريا *K.pneumoniae* أصبحت مقاومتها الحالية للمضادات الحيوية في حالة ازدياد مما جعلها تنتشر بشكل كبير في جميع انحاء العالم (Suay و Pérez ، 2019). ونظراً لما تشكله بكتيريا *K.pneumoniae* من خطورة على حياة الإنسان في المستشفيات والمجتمع ومقاومتها للعديد من المضادات الحيوية تم اجراء هذه الدراسة التي تهدف إلى الكشف الجزيئي عن بعض الجينات التي تُشفر إنتاج إنزيمات البييتالاكتاميز المختلفة من بكتيريا *K. pneumoniae* والمعزولة من مصادر سريرية مختلفة، ويكون ذلك من خلال الخطوات الآتية:

1. عزل وتشخيص بكتيريا *K. pneumoniae* من مصادر سريرية مختلفة بالطرق التقليدية والتشخيص بجهاز الفايك VITEK2.
2. التحري عن العزلات البكتيرية المقاومة للمضادات الحيوية وتحديد العزلات متعددة المقاومة (MDR) و (XDR).
3. التحري المظهري عن بعض عوامل الضراوة منها إنزيمات البييتالاكتاميز (ESBLs ، MBLs ، AmpC) والمحفظة .
4. التحري الجزيئي عن الجينات المشفرة لإنزيمات البييتالاكتاميز في عزلات بكتيريا *K.pneumoniae* (XDR) بتقنية تسلسل الجينوم الكامل Whole Genome Sequence (WGS).
5. تحليل الجينوم باستخدام المعلوماتية الحيوية Bioinformatics .

Summary

Summary

A total of (200) clinical samples were collected from patients suffering from different diseases ,and these samples included urine (90) sample, sputum (43), wounds infection (26), burns infection (23), blood (14), and (4) from spinal fluid. The samples collection was done during the period from September 2023 to January 2024 from Baquba Teaching Hospital, Educational Laboratories and Al Batoool Teaching Hospital / Diyala.

All samples were subjected to bacterial culture, the results showed 132 (66%) samples gave positive result while 68 (34%) sample gave negative result, the isolates were identified by microbiological methods and conform by VITEK2 compact system. The results showed 50 (%37.87) isolates were belonged to *Klebsiella pneumoniae*, as it was 24 (48%) in urine, sputum 8 (16%), blood 6 (12%), wounds 5 (10%), burns 5 (10%), and spinal fluid 2 (4%).

The results of antimicrobial susceptibility test showed that *K. pneumoniae* isolates were resistant to β -lactam antibiotics (Ampicillin 100%, Ceftriaxone 92%, Ceftazidime 74%, Aztreonam 70%, Imipenem and Meropenem 48%, the resistant for Aminoglycosides (Amikacin 48%, Tobramycin 42%, Gentamicin 38%), for Quinolones (Levofloxacin and Ciprofloxacin 46%) while for (Trimethoprim/sulfamethoxazole the resistance reached 68%).

The results of the antimicrobial susceptibility test showed 30 (60%) were multidrug resistance *K. pneumoniae* (MDR), while 14 (28%) isolates were resistance to three antibiotic groups Extensive drug resistance (XDR), 6 (12%) were Multidrug sensitive (MDS).

A twenty isolates were selected from *K. pneumoniae* (MDR,XDR) isolates to determine of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was using

Summary

VITEK2 compact system, the results showed the (MIC) for Ampicillin ranged between (16-32 µg/ml), Aztreonam (16-64 µg/ml), Ceftazidime (4-64 µg/ml), Imipenem (0.25 -16 µg/ml), Meropenem (8-16 µg/ml), Gentamicin (1-16 µg/ml), Amikacin (2-64 µg/ml), Tobramycin (16 µg/ml), Ciprofloxacin (2-4 µg/ml), finally Trimethoprim / sulfamethoxazole (20-320 µg/ml).

Phenotypic detection of some important virulence factors was performed for twenty *K. pneumoniae* (MDR, XDR) isolates, such as phenotypic detection of Extended Spectrum β– Lactamase enzyme (ESBLs), Metallo β– Lactamase enzyme (MBLs), Ampicillinase Class C Beta Lactamase enzyme (AmpC). The percentage of ESBLs was 16 (80%) produced, MBLs 20 (100%) produced, and AmpC 5 (25%) produced. The capsule was also phenotypically detected and the results showed that all isolates under study twenty isolates (MDR, XDR) are surrounded by the capsule.

To study the Whole Genome Sequence (WGS) of *Klebsiella pneumoniae* bacterium, two different clinical isolates from spinal fluid (No. K13) and sputum (No. K43) were selected with resistance to all antibiotics used (XDR), producing β– Lactamase phenotype enzymes and coated with capsules to detect β– Lactamase genes. To find out the NGS sequence of the isolates, the results were analyzed using Illumina MiSeq (v2 reagents) and bioinformatics tools (Resfinder, plasmidfinder) to know the resistance genes and plasmids. Several resistance genes have been detected mediate the production of β-lactamases using WGS, including (ESBLs, MBLs, AmpC) genes, as (*blaSHV-79/28*, *blaTEM1-B*, *blaCTX-M-15*, *blaCMY-6*, *blaNDM-1/2*, *blaMOX-1*, *blaDHA-1*). Furthermore, Quinolone resistance includes (*OqxA*, *OqxB*, *qnrS1*, *qnrB4*, *parC*, *acrR*). In addition to Aminoglycoside modifying enzymes genes (*rpsL*, *aac-(3)IIa*, *aac-(6)Ib3*,

Summary

aadA5, *rmtC*, *aph-(3)Ia*), trimethoprim- sulfamethoxazole (*dfrA17* ,*sul1*), Tetracycline (*tetA* ,*tetD* ,*ramR*), Fosfomycin (*fosA6*), chloramphenicol (*catA2*) resistance genes, while other genes that endow Macrolide resistance (*mphA*), and carbapenem resistance genes (*OmpK35* ,*OmpK36*,*OmpK37*).

As for plasmids, the results of the study showed that isolate (No. K13) carried the IncFIB(K), IncFII(K), while isolate (No. K43) carried IncHI1B(PNDM-MAR), IncF(K)(PCV1099-114), IncFII(K), IncC.

The results showed that there were mutations in some of the genes for the isolates of the study ,including the isolation genes K13 (*ompK36*; *ompK37*), and K43 (*acrR*; *blaSHV-28*).

Raw genomic data for isolates with numbers (K13, K43) were submitted to the National Center for Biotechnology Information (NCBI), and genomic sequences of Iraqi *Klebsiella pneumoniae* isolates were deposited under BioProjects in the name of (ZMT13 ,ZMT43) (Accession numbers PP892203.1, PP892204.1)), respectively.