Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
& Scientific Research
University of Al-Qadisiya
College of Education / Department of Biology

Phenotypic and Molecular Characterization of *blaNDM*-1 & 2 Genes among *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Burn Patients in Baghdad Province

A Thesis

Submitted to the College of Education University of Al-Qadisyia in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of philosophy in Biology / Microbiology

By

Abbas Atyia Hammoudi

MSc. Biology / Microbiology, University of Baghdad 2006

Supervised by

Prof. Dr.

Azhar N. Hussein

2017 A.D. **1438 A.H**

We, the examining committee, certify that we have read this thesis entitled **"Phenotypic and Molecular Characterization of *blaNDM*-1 & 2 Genes among *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Burn patients in Baghdad province "** and examined the student **" Abbas Atiya Hammoudi "** in its contents and that in our opinion, it is accepted for the Degree of Doctor of philosophy of Science in / Microbiology with **(Excellent)** Rating.

Signature:

Name: Dr. Azhar Omran Latif Althahab

Scientific Degree: Professor

Date: / / 20

Chairma

Signature:

Name: Dr. Majid Kadhm Aboud

Scientific Degree: Professor

Date: / / 2018

Member

Signature:

Name: Dr. Luma Abdelhady Zwein

Scientific Degree: Asist. Professor

Date: / / 2018

Member

Signature:

Name: Dr. AbdulBasit AbdulSammd Abdulla

Scientific Degree: Asist. Professor

Date: / /2018

Member

Signature:Name:

Name :Dr. Ibtisam Habeeb Saeed

Scientific Degree: Asist. Professor

Date: / / 2018

Member

Signature

Name: Dr. Azhar N. Hussein

Scientific Degree : Professor

Date : / / 2018

Member and supervisor

I, hereby certify upon the decision of the examining committee.

Signature

Name: Dr. Khalid Jawad Kadhim Al-Adilee

Scientific Degree: Professor

Title: Dean of the College of Education

Date: 12/ 2/ 2018

Summary:

Burn infections are one of the most important impairments that occur in the acute period following injury and colonization by the pathogenic agents, including gram-positive, gram-negative bacteria and yeasts. The study included 210 clinical swab specimens have been collected from burn patients and cultured on blood agar, MacConkey agar, blood agar, chocolate agar and Eosin methylene blue agar, the period of the study, is from 1/ 3 / 2016 to 30 /8 /2016 at different Hospitals in Baghdad city:

Al-Karama Teaching Hospital, Special Burn Hospital, Central Teaching Laboratories, Child protection Teaching Hospital, Imam Ali Hospital. By microscopic characterizations, morphological and biochemical reactions, Single pathogens growth has been shown 112(100 %) isolates; only 42 (37.5 %) isolates of *Klebsiella pneumonia* and 70 (62.50%) belong to other isolates of bacteria while mixed growth isolates 98 (100%). *Klebsiella pneumonia* isolates were identified by conventional biochemical tests and confirmation was done by using analytical profile index 20 E (API 20 E) and VITEK 2 system . The results of detection of some virulence factors of *K. pneumoniae* showed that all isolates were surrounded by capsule, positive formation of a viscous string, the ability to produce the biofilm formation, the ability to produce the sidrophores, (18 isolates) (42.8%) out of (42)isolates were capable to produce bacteriocin and all isolates of *K. pneumoniae* capable to produce urease enzyme.

The results of the study showed that 30 isolates of the total 42 of *K. pneumonia* gave a positive result for the production β-lactamase with percentage (71.4%). The results showed also that (25) (59.5 %)of isolates were capable to produce extended spectrum beta –lactamases (ESBL)

enzyme while the metallo β- lactamase (MBL) enzymes production were done by three phenotypic methods: Double disk synergy test (DDST) ; 19 isolates(45.2 %) out of 42 indicate positive results; Combined EDTA disk test (CMDT) ; 24 isolates (57.1%) out of (42) indicate positive results and Modified Hodge test (MHT) showed that (17) of (42) isolates (40.5 %) positive. All the 42 isolates of *Klebsiella pneumonia* were screened for their antibiotic resistance against the selected (14) antibiotics using Kirby-Bauer disk diffusion method by measuring the diameter of inhibition zones around antibiotic discs. The results showed that frequency resistance of isolates to: Doxycycline were (100 %) ,Tetracycline (95.23%) , Cefotaxime and Pipracillin (85.71%) Ceftriaxone (88.09%), Trimethoprim-Sulfamethoxazol (83.33%) , Ticarcillin (78.57%), Aztreonam (71.42%) , Ceftazidime (69.04%) , Ciprofloxacin (59.52%), Gentamycin (23.80%) , Imipenem (21.42%) , Meropenem and Amikacin(19.04 %). Also the results showed the highest frequency of susceptibility among *K. pneumonia*e was associated to Gentamycin (71.42%) , Meropenem and Amikacin (76.19%) and Imipenem (69.04%).

The results also showed that some isolates were considered to be a multidrug resistant because the isolates have been totally resistant to about 7 to 14 of antibiotics.

Twenty isolates were carried out to detect the presence of New Delhi Metallo-beta-lactamases (*blaNDM*-1,2) genes using PCR technique. The present study showed all 20 (100%) isolates were carried *blaNDM-1* gene and 14 (70%) *blaNDM-2* gene while 6(30 %) showed negative results with *blaNDM-2* gene.

The analysis of (10) clinical origin of *K. pneumoniae* isolates by multilocus sequence typing show the relationship between the local and global isolates which belonged to 7 housekeeping genes: *rpoB, gapA* , *mdh* , *pgi* , *phoE, infB* and *tonB.*

The results of the present study showed the 10 isolates of *K. pneumoniae* were identified into different sequence type (ST): ST 14 and 15 for (IQK1, IQK2, IQK3, IQK4, IQK5, IQK6 and IQK7) , ST 266, 54, 709, 728 and 1177 for (IQK8 and IQK9) and ST 665 , 975 and 2149 for (IQK10). Also the result showed 100% identities with previously reported genes in the genes bank. There was no information on the sequence type (ST) (an allelic profile) of *K. pneumoniae* in Iraq.

According to the results of present study the most occurrence clones found in Baghdad hospitals were endemic ST14 and 15, which accounted 70% of the isolates (n = 10). The presence of the ST14 and 15 clones in Iraq which came closer to global (14 and 15 STs) clones, might be indicating intercontinental transmission, because these clones were added to the list of the strains that isolated from different countries .

الخلاصة:

تعتبرالتهابات الحروق واحدة من أهم المضاعفات التي تحدث في الفترة الحادة االتي تلي الإصابة والاستيطان من قبل العوامل المسببة للأمراض، بما في ذلك البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام والخمائر.شملت الدراسة جمع 210 عينة سريرية من مرضى الحروق وزراعتها على وسط اكار الدم ، وسط الماكونكي وسط الجكليت ووسط Eosin methylene blue للفترة من 3/1 /2016 الى 8/30/ 2016 من مستشفيات مختلفة في مدينة بغداد :مستشفى الكرامة التعليمي ، مستشفى الحروق التخصصي ، المختبرات التعليمية المركزية ومستشفى الامام علي . اظهرت نتائج التشخيص في هذه الدراسة - وبالاعتماد على الصفات المظهرية والمجهرية والفحوصات الكيموحياتية وتأكيد التشخيص باستخدام نظام API 20 E و VITEK 2 – ان عدد العزلات المفردة (112) (100%) منها (42) عزلة (37.5%) تعود لبكتيريا الكليبسيلا الرئوية و (70) عزلة (62.50%) تعود لبكتيريا اخرى بينما كانت (98) عزلة (100%) كعزلات مختلطة .

اوضحت نتائج التحري عن بعض عوامل الضراوة للكليبسيلا الرئوية بان جميع العزلات محاطة بمحفظة، وانها موجبة لتكوين المادة اللاصقة ولها القدرة على انتاج الغشاء الحيوي وانتاج السايدروفور وان (18) عزلة (42.8%) لها القدرة على انتاج البكتيريوسين وان جميع العزلات لها القدرة على انتاج انزيم اليوريز .

اوضحت نتائج الدراسة بان (30) (71.4%) عزلة من الكليبسيلا الرئوية قادرة على انتاج انزيمات البيتالاكتميز وان(25) (59.5 %) عزلة قادرة على انتاج انزيمات البيتالاكتميز واسعة الطيف اما انزيمات البيتالاكتميز المعدنية فتم التحري عنها بثلاثة طرق مظهرية: Double disk synergyو Combined EDTA disk test وModified Hodge test فكانت (19) (45.2%) عزلة موجبة لطريقة Double disk synergy و (24) (57.1%) عزلة موجبة لطريقةCombined EDTA disk test و(17) (40.5 %) عزلة موجبة لطريقة Modified Hodge test.

فحصت مقاومة جميع عزلات الدراسة (42) ضد (14) مضادا حيويا باستعمال طريقة انتشار القرص وقياس مناطق التثبيط حول اقراص المضادات الحيوية حيث اظهرت نتائج الدراسة تكرار المقاومة للمضادات :

Doxycycline (100%)، Tetracycline (95.23%)، Cefotaxime (85.71%) و Pipracillin ، Ceftriaxone (88.09%)، Trimethoprim- (83.33%)

Ceftazidime ، Aztreonam(71.42%)، Ticarcillin (%78.57) ،Sulfamethoxazol (69.04%)،(59.52%)Ciprofloxacin ، (23.80%)Gentamycin ،Imipenem (21.42%)،(19.04%)Meropenem and Amikacin

واظهرت النتائج ايضا ان اعلى تردد للحساسية بين عزلات الكليبسيلا الرئوية كانت مترافقة مع المضادات Meropenem وamikacin (76.19%) وGentamycin (71.42%) و Imipenem (69.04%) .

اظهرت نتائج الدراسة ان بعض العزلات اعتبرت عزلات ذات مقاومة متعددة تجاه 7 الى 14 مضاد حيوي .

اوضحت نتائج التحري الجزيئي عن وجود جينات البيتالاكتميز المعدنية السلالة الهندية 1 و2 في (20) عزلة باستعمال تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل. ان (20) (100 %) عزلة تحمل جينات البيتالاكتميز المعدنية السلالة الهندية 1 وان 14 (70%) عزلة تحمل جينات البيتالاكتميز المعدنية السلالة الهندية 2 بينما كانت 6(30 %) عزلات لا تحمل جينات السلالة الهندية 2.

اظهرت نتائج تحليل تسلسل جينات الكليبسيلا الرئوية العلاقة بين العزلات المحلية والعالمية والتي تنتمي الى الجينات السبعة الخاصة بها :

rpoB. gapA . mdh . pgi . phoE. infB and *tonB.*

اظهرت نتائج الدراسة الحالية ان العزلات العشر للكلبسيلا الرئوية تم تحديدها في تسلسلات مختلفة: 14 و 15 لعزلات الكليبسيلا العراقية ((IQK1، IQK2، IQK3، IQK4، IQK5، IQK6 و IQK7)، و 266، 54، 709، 728 و 1177 للعزلات (IQK8 و IQK9) و 665، 975 و 2149 للعزلة (IQK10). وأظهرت النتائج أيضا تطابق العزلات العراقية 100٪ مع العزلات المسجلة سابقا في بنك الجينات. ولا توجد معلومات عن تسلسل جينات الكليبسيلا الرئوية في العراق .

وطبقا لنتائج الدراسة الحالية فإن معظم الجينات الموجودة في مستشفيات بغداد هي مستوطنة وتعود للنوع ST14 و 15، والتي شكلت 70٪ من العزلات (ن = 10). وقد يكون وجود هذه الجينات في العراق والقريبة من الجينات العالمية (14 و 15)، يشير إلى انتقالها عبر القارات، لكونها أضيفت إلى قائمة السلالات التي تم عزلها من بلدان مختلفة .