Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
and Scientific Research
University of Thi-Qar
College of Science

Detection of metallo β_lactamases in *Acinetobacter baumannii* that isolated from patients with burn infections

A Thesis

Submitted to the College of Science
University of Thi-Qar
In partial Fulfillment of the Requirements
For the Master Degree of Science in Pathologecal analysis / Medical Microbiology

By

Safaa Majid Kathom
B.Sc. Pathologecal analysis (Thi-Qar University)
(2015)

Supervisor

Asst . Prof .Dr. Intidhaar Naeem Abid

2019 A.D **1440 A.H**

Summary

The present study aim to detect the isolation and identification of *Acinetobacter baumannii* from burns patients infections as well as to study some of their virulence factors and study the ability of bacteria to produce Metallo –beta –lactamase.

This study includes 205 burn patients from Al-Hussien Teaching Hospital and out lab. in Al-Nasiriyah city . The specimens collected during period from August 2018 to February 2019. Specimens are taken by swabs from burned area and then inoculated on blood agar and MacConkey agar media. The isolates are diagnosed by microscopic examination, biochemical tests , API 20 E and VITEK- 2 , and confirmed to detect by PCR assay targeting *bla* OXA-51 like gene.

The results have shown that most cases of burn injury include females 138 (67.31%) more than males 67 (32.68%) . The age group (20-30) years is the most affected with burn injury , it is recorded 66(32.19%) . The second degree of burns is registered as higher affected 82 (96.34%) with burn injury.

The study appears that , 192(93.65%) out of 205 specimens are given positive bacteria culture . It has been found that *Pseudomonas aeruginosa* are more frequent among bacterial isolates of burn infections , it is registered 55(23.10%) isolates . It is found that 20 isolates of *A.baumannii* and 2 isolates of *A. loffii* are identified from this study. 9(45%) of *A.baumannii* appeared in the third degree of burns.

The results show that all isolates of *A.baumannii* have OXA-*51* like gene. some virulence factors of bacteria detected such as biofilm formation , colony factor antigens producing , gelatin liquification and capsule ,and the results reveal that 85% ,75% , 65% and 100% of isolates are positive to these virulence factors respectively .

The effect of some environmental factors on bacterial growth are studied.It is found that the optimal range of pH for bacterial growth is 6-10 ,and the optimal growth of bacteria is in a concentration 5% of NaCl ,as well as , it shows that all bacterial isolates have the ability to grow in 44 °C.

The study also shows that all isolates reveal a high resistance to all antibiotics which are used in this study , it is ranged between 45 % to 100% .

The high values of MICs are registered to ticarcillin (100%) , piperacillin (95%), gentamicin (90%) , Imipenem (75%) ,Aztreonam (70%) , piperacillin/tazobactam (65%) and Minocycline (60%).

All isolates of *A.baumannii* (100%) show MDR bacteria resistance to 3 classes of antibiotics , they are distributed to 1, 1, 3, 2and 1of isolates are resistant to 3,4 , 5 ,6 and 7 of antibiotics respectively . (15%) of isolates are extensive drug resistance (XDR). At the same time , it is appeared that(45%) of *A.baumannii* are pan drug resistance (PDR).

The results found that all isolates of *A.baumannii* (100%) are produced beta-lactamases , 7(35%) of isolates are producing ESBLs by a confirmatory test (MDDST) .

This study shows that 15(75%) of *A.baumannii* produce MβLs by Combined Disk test (CDT) method . There results of molecular study

showed 13(65%) ,5(25%) and 12(60%) for detect of *bal*-VIM , *bal*-IMP and *bal*-NDM-1 genes respectively from of *A.baumannii* .

In the analysis of the nucleotide sequence of the partial *bla* OXA-51 like gene ,the three isolates are registered globally in the NCBI Gen bank, and the accession numbers of these isolates are NO.1 (MK659923), NO.2 (MK659924) and NO.3(MK659925) . The results for these isolates show genetically new variants than NCBI BLAST homologous sequence.

الخلاصة

تضمنت الدراسة عزل وتشخيص بكتيريا *Acinetobacter baumannii* من اصابات مرضى الحروق وكذلك دراسة بعض عوامل الضراوة و قدرة البكتيريا على إنتاج - Metallo beta -lactamase.

شملت هذه الدراسة جمع 205 مسحة سريرية من مرضى الحروق في مستشفى الحسين التعليمي و وحدات رعاية مرضى الحروق والعيادات في مدينة الناصرية خلال الفترة الزمنية من اغسطس2018 الى شباط 2019 . تم أخذ المسحات من قيح المناطق المحروقة للمرضى ومن ثم زراعتها على أجار الدم وأجار الماكونكي. شخصت العزلات البكتيريه باستخدام الاختبارات المظهرية والبايوكيميائية ، API 20 E و VITEK - 2 ، بالإضافة إلى التشخيص الجزيئي للكشف عن OXA-51like gene بواسطة تقنية PCR.

ان نسبة حالات الحروق عند الاناث (67.31٪) اكثر مقارنة مع الذكور . كانت الفئة العمرية (20-30) سنة هي الأكثر إصابة بالحروق من الفئات العمرية الاخرى ، حيث سجلت 66 (32.19٪) ولوحظ ان حروق الدرجة الثانية كانت اكثر درجات الحروق اصابة اذ سجلت 79 (96.34 ٪) إصابة.

بينت الدراسة أن 192 (93.65٪) عينة قد اعطت نتائج زرع بكتيري موجب من أصل 205 عينة. وقد وجد أن بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* قد احتلت المرتبة الاولى من بين العزلات البكتيرية الاخرى المعزولة من مرضى اصابات الحروق اذ سجلت 55 (23.10٪)عزلة .

وجدت نتائج الدراسة الحالية 20 عزلة بكتيرية تعود الى *A.baumannii* وعزلتين ل *A. loffii* ، اظهرت 9 (45٪) عزلات من *A.baumannii* في حروق الدرجة الثالثة، وكانت جميع عزلات *A.baumannii* كانت تحتوي على الجين التشخيصي OXA-51like gene .

شملت هذه الدراسة الكشف عن بعض عوامل الضراوة لبكتريا *A.baumannii* وقد وجد ان 85 ٪ من العزلات كانت قادرة على تكوين الغشاء الحيوي ، و 75 ٪ امتلكت مستضدات عامل الاستيطان و 65 ٪ كانت قادرة على انتاج انزيم تميع الجيلاتين و100% قد امتلكت المحفظه .

تم دراسة تأثير بعض العوامل البيئية على نمو البكتيريا ومن بينها الرقم الهيدروجيني وتحمل الملوحه ودرجات الحرارة العالية . و وجد أنها تنمو في رقم هيدروجيني يتراوح بين 6- 10 ، و

لها القابلية على النمو بتركيز 5 ٪ من كلوريد الصوديوم ودرجات حرارة عاليه تصل الى 44 درجة مئوية.

أوضحت الدراسة أن جميع العزلات أظهرت مقاومة عالية لجميع المضادات الحيوية المستخدمة في هذه الدراسة ، حيث تراوحت نسبة المقاومة من 45٪ إلى 100٪.

سجلت الدراسة الحالية قيم عالية لاختبار الـ MICs لجميع المضادات المستخدمة في هذا الاختبار ، حيث سجل اعلى قيم MICsللمضادين Imipenem و Meropenem والذي بلغ قيمته (1-256) ماكروغرام/مل .

بينت النتائج ان جميع العزلات كانت MDR ، كان من ضمنها 3 (15 ٪) عزلات ذات مقاومة دوائية واسعة النطاق (XDR و 9 (45٪) ذات مقاومة فائقة (PDR). وكانت جميع العزلات لها القابلية على انتاج انزيمات البيتا - لاكتاميز، بينما 7 (35 ٪) من العزلات انتجت انزيمات البيتا لاكتاميز الواسعة الطيف ESBLs عن طريق الاختبار التأكيدي MDDST.

اظهرت الدراسة الحالية ان 15(75٪) من بكتريا *A.baumannii* قد انتجت انزيمات MBLs باستخدام طريقة CDT ، وعند الكشف عن الجينات المنتجة لهذه الأنزايمات بواسطة الطرق الجزيئية عن طريق تقنية PCR ، والتي تضمنت جينات *bal*-VIM و *bal*-IMP و *bal*-NDA-1 ،وجد ان 13 (65٪) و 5 (25٪) و 12 (60٪) عزلة كانت منتجة لهذه الانزيمات على التوالي.

تم اجراء تحليل تتابع النوكليوتيدات لجين *bla*-OXA-51 like gene لثلاث عزلات تعود الى بكتيريا *A.baumannii* ، وعليه تم تسجيل العزلات عالميا في بنك الجيناتNCBI Gen بارقام انضمام NO.1 (MK659923) و NO.2 (MK659924) وNO.3 (MK659925). وقد تضمن هذه العزلات تغيرات نوعيه جديده في التسلسل الجيني المتماثل ب NCBI BLAST.

جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ذي قار/ كلية العلوم
قسم التحليلات المرضية/ الدراسات العليا

الكشف عن أنزيماتmetallo β_lactamases في بكتريا *Acinetobacter baumannii* المعزولة من أصابات مرضى الحروق

رسالة مقدمة إلى

مجلس كلية العلوم/ جامعة ذي قار

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم التحليلات المرضية/الاحياء المجهرية

من قبل

صفاء ماجد كاظم

بكالوريوس علوم تحليلات مرضية/ جامعة ذي قار (2015)

تحت اشراف

ا.م.د.أنتظار نعيم عبد

1440 هـ **2019 م**