Ministry of Higher Education and Scientific Research

Al-Muthnna University

College of Science

Molecular Detection of AmpC gene families Encoding for Antibiotic Resistance among Escherichia coli isolated from Patients with Urinary Tract Infection (UTI) in Al-Najaf Hospitals

A thesis

Submitted to the council of College of Science, Al-Muthanna University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Microbiology

BY

Abeer Mohammed Ali Al-garawyi

B.Sc. Biology/ Al-Muthanna University (2010)

Supervised by

Asst. Prof. Dr.Salman Aziz AL-Jubouri

Dept. of Microbiology/College of Medicine

Kufa University

Asst. prof Dr. Yassir Dekeel Alasadiy

Dept. of Biology /college of Science

Al-Muthanna University

20 June 2013A.C. **11 Shaaban 1434H**

جامعة المثنى

كلية العلوم

الكشف الجزيئي عن عوائل جيناتAmpC التي تشفر المقاومة للمضادات الحياتية بين الأشريشيا القولونية المعزولة من المرضى المصابين بالتهاب المجاري البولية في مستشفيات النجف

رسالة

مقدمة إلى مجلس كلية العلوم / جامعة المثنى وهي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير علوم في علوم الحياة / الأحياء المجهرية

من قبل

عبير محمد علي جاسم الكرعاوي

بكالوريوس علوم الحياة / جامعة المثنى/ ٢٠١٠

بإشراف

الأستاذ المساعد

د. ياسر دخيل كريمش الاسدي

الأستاذ المساعد

د. سلمان عزيز عدوس الجبوري

شعبان ١٤٣٤ هـ

حزيران ٢٠١٣ م

Abstract

our study was designed to detect and evaluation Ampicillin class C β-lactamases genes from *Escherichia coli* isolates in patients with UTI by using of PCR technique .

In the present study, 250 mid-stream urine samples were collected from patients suspected to had urinary tract infection (UTI). The urine samples collected from three hospitals in Najaf during the period from (january 2012 to April 2012) , and screened for the presence of *E. coli* . The growth of $\geq 10^5$ colony forming units/ml were considered significant bacteriuria.

A total of 130 (52%) samples with significant bacteriuria were detected. The study showed higher incidence of UTI in females (73.08%) than males (26.9%).The bacteria which were grown on culture of all the 130 urine samples with significant bacteriauria were as follows: 60 (46.2 %) isolates of *E. coli* and 70 (53.8%) were other isolates such as *P. aerogenosa* , *Proteus mirabilis* , *K. pneumonia* and *Staphylococcus aureus.*

The sixty isolates of *E. coli* isolates were initially screened for susceptibility to β-lactam antibiotics and the results demonstrated that there was 53(88.3%) of the tested isolates were resistant to both ampicillin and amoxicillin. All the 53 β-lactams resistant isolates were tested for their antibiotic resistance against 17 selected antimicrobial agents. All the isolates were found to be resistant to a minimum of 3 classes of antibiotics.

The majority of β-lactams resistant *E. coli* 30(56.6%) isolates were found to be able to produce β-lactamase enzyme with rapid iodometric method. All the 53 β-lactams resistant *E. coli* isolates were tested for cefoxitin susceptibility and ability to produce AmpC β-lactamase by two methods; modified three dimensional test and AmpC disk test , as well as further tested for their ability to produce chromosomal-mediated AmpC β-lactamases using ceftazidime-imipenem antagonism test. The results revealed that 28 (52.8%)

isolates were cefoxitin resistant and 23(43.4%) isolates were confirmed as AmpC producers by the two above methods , respectively. Conversely, none of the 53 isolates were identified as inducible of AmpC β-lactamase producers by the ceftazidime-imipenem antagonism test. Therefore, all of these *E.coli* isolates were considered plasmide mediated ampC β-lactamases.

The results showed that only 18 (34%) isolates gave positive results with bla_{AmpC} gene and all bla_{AmpC} positive isolates showed diversity presence of plasmid-mediated AmpC β-lactamases. The genes that encoded FOX, CIT, DHA, EBC, ACC and MOX were found in the percentage of 44.4, 38.9, 27.8, 50.0, 22.2 and 27.8, respectively. Multiplex PCR assay revealed that bla_{FOX} and bla_{CIT} as well as bla_{DHA} and bla_{EBC} *ampC* genes were detected in 3 (16.7%) and 2 (11.1%) isolates, respectively,While the remaining 13 (72.2%) isolates carried only one *ampC* gene. Such results showed that ampC β-lactamases producing by *E. coli* isolates were recognized in both phenotypic and molecular methods in local isolates recovered from patients suspected to have UTI in Najaf hospitals.

الخلاصة :

الدراسة هدفت إلى معرفة مدى تواجد إنزيمات البيتالاكتاميز نوع AmpC في بكتريا *Escherichia coli* المعزولة من المرضى الذين لديهم البيلة البكتيرية وتقييم انتشار جينات إنزيم البيتالاكتاميز نوع AmpC التي تشمل (bla_{FOX} , bla_{DHA} , bla_{ACC} , bla_{EBC} , bla_{CIT}, bla_{MOX}) بين العزلات المنتجة لهذا الأنزيم بواسطة استعمال تقنية سلسة تفاعلات البلمرة PCR .

جمعت ٢٥٠ عينة من منتصف إدرار المرضى الذين يعتقد بأنهم مصابين بالتهاب المسالك البولية، من ثلاث مستشفيات رئيسية في النجف الاشرف خلال الفترة من(كانون الثاني ٢٠١٢الى نيسان ٢٠١٢) ،وبعد ذالك فحصت العينات لتحري عن بكتيريا الاشريشيا القولونية . حيث تم اعتبار النمو الذي هو $\geq ١٠^{٥}$ وحدة تكوين المستعمرة لكل مل من الإدرار معيار البيلة البكتيريةsignificant bacteriuria .

حيث أظهرت النتائج إن ١٣٠ (٥٢%) من عينات الإدرار المأخوذة من المرضى المشكوك بإصابتهم بالتهاب المسالك البولية كانوا مصابين فعلا بالبيلا البكتيرية significant bacteriuria ،كما أظهرت هذه الدراسة مستوى مرتفع لحدوث التهاب المجاري البولية في النساء (73.08%) أكثر من الرجال (26.9%)، وكانت عزلات الاشريشيا القولونية (٤٦.٢%) هي الأكثر شيوعا بين الممرضات المعزولة بينما (53.8%) كانت بكتيريا أخرى سالبة وموجبة إلى صبغة كرام .

وقد اجري ايضا مسح أولي للعزلات المقاومة إلى مضادات البيتالاكتام وأظهرت النتائج إن ٥٣ (88.3%) منها مقاومة لمضادي الامبيسيلين والاموكسيسلين .كما فحصت حساسية العزلات المقاومة لمضادات البيتالاكتام اتجاه ١٧ نوع من المضادات الحياتية بطريقة انتشار القرص لـ كيربي- باور وكانت جميع العزلات مقاومة على الأقل ثلاثة أصناف من المضادات الحياتية التي خضعت لها بهذا الاختبار لذلك اعتبرت هذه العزلات متعددة المقاومة، كما أظهرت النتائج في هذه الدراسة إن ٣٠(٥٦.٦%) من عزلات الاشريشيا القولونية المقاومة لمضادات البيتالاكتام أعطت فحص موجب لإنزيم البيتالاكتاميز باستخدام طريقة اليود القياسية السريعة، كذالك أظهرت نتائج المسح الأولي للعزلات المقاومة لمضادات البيتالاكتام أن (52.8%) منها كانت مقاومة للسيفوكسيتين، ايضا اختبرت هذه العزلات لمعرفة قابليتها على إنتاج إنزيمات AmpC بيتالاكتاميز وباستخدام طريقتين disk AmpC test, Modified three dimensional test ، وأظهرت النتائج إن ٢٣ عزلة كانت

منتجة لأنزيمات AmpC بيتالاكتاميز باستخدام هاتين الطريقتين .كما اختبرت هذه العزلات لمعرفة قابليتها على إنتاج إنزيمات AmpC بيتالاكتاميز المحفزة باستخدام طريقة Ceftazidime-imipenem antagonism test وأظهرت النتائج عدم وجود عزلات منتجة لإنزيمات AmpC المستحثةinducible AmpC β-lactamase لذلك اعتبرت عزلات الاشريشيا القولونية في هذه الدراسة منتجة لإنزيمات AmpC البلازميدية PABLs. كما أظهرت النتائج أن (100%) من العزلات المقاومة لمضادات البيتالاكتام كانت حساسة للاميبينيم، بينما حساسية العزلات إلى الاميكاسين والسيبروفلوكساسين فكانت (٢٢.٢% ، ٣٣.٣%) على التوالي ، وهذه المضادات الحياتية كانت الأكثر كفائه ضد العزلات المنتجة لإنزيمات البيتالاكتاميز ، ولدى اختبار حساسيتها للمضادات الحياتية المستخدمة وجد إن ٣ عزلات (١٦.٧%) كانت متعددة المقاومة (MDR) و ١٥(٨٣.٣%) مفرطة المقاومة للمضادات الحياتية (XDR) .

كما كشفت تقنية PCR إن ١٨ عزلة (٣٤%) أعطت تفاعلاً موجبا مع بادئ الموروث bla_{AmpC} كما إنه تواجدت الموروثات المُنتِجة لإنزيمات AmpC البلازميدية PABL بنسب متفاوتة بين العزلات الحاملة للموروث bla_{AmpC} حيث كانت ٤٤.٤%، ٣٨.٩%، ٢٧.٨%، ٥٠% ،٢٢.٢% و ٢٧.٨ للموروثات المُنتِجة لإنزيمات الـ ACC, EBC, DHA, CIT, FOX و MOX على التوالي. استخدمت تقنية multiplex PCR للتحري عن موروثات PABLs و قد تم الكشف عن إمكانية بعض العزلات على حمل مورثتان (bla_{FOX} و bla_{CIT})او موروثتان (bla_{DHA} وbla_{EBC}) في نفس العزلة . حيث لوحظ انه ثلاثة عزلات (١٦.٧%) احتوت على المورثين (bla_{FOX} وbla_{CIT}) وعزلتين فقط (١١.١%) احتوت على المورثين (bla_{DHA} وbla_{EBC}) بينما العزلات ١٣(٧٢.٢%) المتبقية كل منها حملت جين واحد فقط .