

**The Republic of Iraq
Ministry of Higher Education and
Scientific Research
Mosul University / College of Science
Department of biology**



**Phenotypic and Molecular diagnosis of
Stenotrophomonas maltophilia Isolated from clinical
sources in Mosul city**

A Thesis submitted by

Bassima Mohammed Ali Husein Al-Mtiwoti

M.Sc. Thesis

Biology /Microbiology

Supervised by

Professor

Dr. Essra Ghanim Hazim Alsammak

1445 A.H.

2023 A.D.

Abstract

During the period from July to December (2022), 11 strains of *Stenotrophomonas maltophilia* were obtained from 375 samples including (349) clinical samples, in addition to (26) Swabs from the surfaces of medical devices collected from (Asalam teaching hospital, Mosul general hospital, Aljumhuri teaching hospital, Chest Diseases Hospital, Ibi Sina teaching hospital, and Specialized burn center) in Mosul City.

Biochemical tests and VITEK-2 compact system were used to identify the non lactose fermented and oxidase-negative isolates. Results showed that *S. maltophilia* was identified in 11 strains of all bacterial isolates, the highest percentage 5 (45%) of *S. maltophilia* was isolated from urinary tract infection compared to other sites of infections. Other isolates were recovered from burn infections were 2 (18%) and 2 (18%) of strains from cystic fibrosis patients sputum, in addition to 1 (9%) of strains from each of wound and medical devices. While no isolates were recovered from throat, blood and CSF samples.

The resistance percentage to the ampicillin, gentamicin, and amikacin (100%), cefixime (91%), imipenem (64%), meropenem (55%), azithromycin (36%), nalidixic acid and trimethoprim (18%) and ciprofloxacin (0%).

All strains have the ability to produce beta-lactamase enzyme when tested by iodometric method. Moreover, results showed that (55%) of isolates were able to produce a slime layer.

The results of detection of biofilm formation by tube method showed that (45%) of isolates were strongly adherent, (36%) had moderate productivity, (9%) weakly adherent and (9%) isolates were non-adherent while ability of *S. maltophilia* to form biofilm by microtiter plate method was strong (73%), moderate (27%).

Extracellular virulence factors of *S. maltophilia* were studied. All (11) isolates of *S. maltophilia* (100 %) were produced Siderophores, protease, and

lipase, (73%) produce DNase, (64%) produced gelatinase and (45%) produced lecithinase.

As the biosurfactants production were investigated, *S.maltophilia* didnot show any hemolysis, while all isolates gives positive results for the oil dispersion and drop collapse methods using olive oil as a nitrogen source giving highest production rate of biosurfactant than glycerol.

Molecular diagnosis was carried out using universal 16S r RNA gene for 14 understudy isolates. The sequences were determined using Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) in National Center for Biotechnology Information (NCBI). Results showed that 11 of them belong to *Stenotrophomonas maltophilia*, while the three remaining isolates belong to *Enterobacter hormaechei*. Also, when molecular diagnosis was carried out using the designed specific primers that were designed in the current study for detecting 23S rRNA gene, the eleven isolates belong to *S.maltophilia* that amplified at 816 bp. Phylogenetic tree of all isolates that based on 16S rRNA gene revealed three main clusters A, B and C. *Stenotrophomonas maltophilia* clustered on A, and B, while *Enterobacter hormaechei* on C. The first cluster A contained 9 strains with the bootstrap value was (99.86%), the second cluster B with the bootstrap value of (99.88%) and the third cluster C with the bootstrap value of (99.88%). All sequences were submitted to the gene bank (NCBI) and were given the accession numbers. While studying the phylogenetic relationship between the strains based on 23S rRNA revealed that *S.maltophilia* clustered in A and B. Seven isolates linked in cluster A with a bootstrap value of (99.99%) and two isolates in cluster B with a bootstrap value (98.88%). All sequences were submitted to the gene bank (NCBI) and were given the accession numbers.

The results of PCR amplification of the *fimv* gene that is designed during the current study among *S.maltophilia* isolates showed that (73%) of isolates give positive results at 736 bp.

The results of PCR amplification of the *smqnr* gene among *S. maltophilia* isolates showed that only one isolate (9%) give positive result for this gene, while all isolates gave a negative results for *int1* and *sul-1* genes.

الخلاصة

خلال الفترة من شهر تموز الى كانون الاول من سنة 2022 تم الحصول على احدا عشر عزلة للنوع البكتيري *Stenotrophomonas. maltophilia* من مجموع 375 عينة والتي تضمنت 349 عينة سريرية بالإضافة الى 26 مسحة من أسطح الاجهزة الطبية, العينات جمعت من مستشفيات عدة في مدينة الموصل (مستشفى السلام التعليمي - مستشفى الموصل العام - مستشفى الجمهوري التعليمي - مستشفى الامراض الصدرية - مستشفى ابن سينا التعليمي - مركز الحروق التخصصي).

أستخدمت الاختبارات الكيموحيوية ونظام VITEK-2 للتعرف على العزلات غير المخمرة للاكتوز والعزلات السالبة لاختبار الاوكسيدز. وكانت أعلى نسبة لبكتريا *S. maltophilia* من العينات المأخوذة من عدوى المسالك البولية ونسبة ٥(45%) مقارنة بمواقع العدوى الاخرى. فيما كانت نسبة العزلات المأخوذة من الحروق 2(18%) ومن القشع والمأخوذة من مرضى التليف الكيسي بلغت 2(18%), بالإضافة الى 1(9%) من العزلات من كل من الجروح والاجهزة الطبية بينما لم يتم الحصول على عزلات من الحلق والدم وعينات سائل النخاع الشوكي.

نسبة المقاومة للأموكسيسيلين والجنتاميسين والأميكاسين (100%) ، سيفيكسيم (91%) ، إيميبينيم (64%) ، الميروبينيم (55%) ، أزيثروميسين (36%) ، حمض الناليديكسيك وتريميثوبريم (18%) ، سيبروفلوكساسين (0%) وكانت جميع العزلات لها القدرة على إنتاج إنزيم بيتا لاكتاميز.

أظهرت النتائج أن (55%) من العزلات كانت قادرة على إنتاج الطبقة الهلامية على وسط اكار الكونغو بينما نتيجة تكوين الغشاء الحيوي باستخدام طريقة الانابيب كانت ٥(45%) عزلات شديدة الالتصاق، ٤(36%) ذات إنتاجية متوسطة، ١(9%) ضعيفة الالتصاق و ١(9%) عزلات غير ملتصقة بينما كانت قدرة *S.maltophilia* بواسطة الصفيحة العيارية كانت النسبة قوية الالتصاق ٨(73%) ، معتدلة الالتصاق ٣(27%).

تمت دراسة عوامل الضراوة الخارج خلوية في *S. maltophilia* ، وأنتجت جميع السلالات ال(11) بنسبة 100 % كل من (Siderophores ، البروتياز ، والليباز) وأنتجت DNase بنسبة (73%) و (64%) للجيلاتيناز و (45%) أنتجت الليسيثيناز.

جميع سلالات *S.maltophilia* ، أنتجت المواد الحبوية الفعالة سطحيا باستخدام طريقة تشتت الزيت وطرق الانهيار باستخدام زيت الزيتون كمصدر للنيتروجين الذي اعطى أعلى معدل إنتاج من الجلسرين.

تم إجراء التشخيص الجزيئي باستخدام جين 16SrRNA العام لـ 14 عزلة ، وتم تحديد التسلسل باستخدام BLAST ضمن NCBI ، وأظهرت النتائج أن 11 منها تنتمي إلى النوع البكتيري *Stenotrophomonas maltophilia* بينما العزلات الثلاثة المتبقية تنتمي إلى النوع *Enterobacter hormaechei*، وعندما تم تأكيد التشخيص الجزيئي باستخدام بادئات محددة مصممة في الدراسة الحالية للكشف عن جين 23SrRNA وتبين ان السلالات (١١) كلها تعود لنوع *S.maltophilia* ,تضخمت عند 816 زوج قاعدي.

كشفت شجرة التطور لجميع العزلات التي تعتمد على جين 16SrRNA عن ثلاث مجموعات رئيسية A و B و C، المجموعة A ضمنت عدد ٩ من السلالات على مستوى تشابه (99.86% و المجموعة الثانية B ضمنت سلالتين على مستوى تشابه (99.88%) والثالثة C ضمنت ثلاث سلالات على مستوى تشابه (99.88%) ، تم ادخال جميع السلالات لبنك الجينات NCBI وتم ضمن ارقام السلسلة . أثناء دراسة العلاقة التطورية بين السلالات بناءً على 23SrRNA ، اجتمعت سلالات *S.maltophilia* في عنقودين A و B. اذ ارتبطت سبعة سلالات في المجموعة A عند مستوى تشابه (99.99%) وعزلتين في المجموعة B عند مستوى تشابه (98.88%). تم ادخال جميع التسلسلات في بنك الجينات و إعطاؤهم أرقام السلسلة.

أظهرت نتائج تضخيم PCR للجين *fimv* المصمم خلال الدراسة الحالية بين عزلات *S.maltophilia* أن (73%) من العزلات أعطت نتائج إيجابية عند 736 زوج قاعدي.

أظهرت نتائج تضخيم PCR لجين *smqnr* بين عزلات *S. maltophilia* أن عزلة واحدة فقط (9%) أعطت نتيجة إيجابية لهذا الجين ، بينما أعطت جميع العزلات نتائج سلبية للجين *int1* و *sul-1*.



جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة الموصل / كلية العلوم

قسم علوم الحياة

التشخيص المظهري والجزئي لبكتيريا

Stenotrophomonas maltophilia المعزولة من عينات

سريرية في مدينة الموصل

باسمة محمد علي حسين المتيوتي

رسالة ماجستير

علوم الحياة / احياء مجهرية

باشراف

الاستاذ

الدكتورة اسراء غانم حازم السماك