Ministry of Higher Education and

Scientific Research

University of Mosul

College of Science

Department of Biology

Efficiency of HiCrome *Acinetobacter* Agar in Identifying *Acinetobacter baumannii* from Clinical Sources and Studying its Plasmid Characteristics

Nisreen Abdullah Fathee Mahmood Alnuaimi

M.Sc. Thesis

In

Biology / Microbiology

Supervised by

Asst. Prof.

Dr. Rayan Mazin Faisal Al-Obaidy

144٦ A.H **202٤ A.D**

Abstract

One hundred and seventy specimens have been collected from Mosul Hospitals/ Iraq. The specimens included 34.1% burns, 29.4% urine, 22.3% wounds, 11.7% sputum, and 4.1% CSF samples. Out of 170 samples, 90 samples produced growth on HiCrome *Acinetobacte*r Agar. *Acinetobacter baumannii* on HiCrome *Acinetobacter* Agar should appear as yellow to light purple colonies while inhibiting all other types of bacteria. However, the current study shows that colonies have appeared round and mucous and differed in their color. Most of the colonies appeared purple (35 light purple and 51 slightly darker purple), the remaining four isolates are 3 white and 1 yellow, indicating that 96.6% of the isolates belong to *A. baumannii* The difference in colony color was not mentioned in the instructions provided by Himedia for HiCrome *Acinetobacter* Agar. Therefore, further identification is subjected to identify the isolates obtained.

Microscopic examination of isolates reveals all isolates are Gram-negative, but white colonies are identified as Candida spp. The growth of these colonies on HiCrome *Acinetobacter* Agar is believed to be due to ineffective antibiotics and lack of antifungals. Colonies were subjected to oxidase test, knowing that *A. baumannii* is negative towards oxidase. The results showed that the 35 light purple colonies were negative, while the 51 slightly darker purple colonies, were positive towards oxidase. On the other hand, the light yellow colony was also oxidase negative. Using oxidase has reduced the isolation rate for *A. baumannii* from 96.6% to 40 %. This is a huge drawback for HiCrome *Acinetobacter* Agar when used alone to identify *A. baumannii*.

To differentiate *A. baumannii* from lactose fermenters belonging to enterobacteriaceae, all isolated bacteria were grown on MacConkey agar. The results showed that the single light yellow isolate and the 51 slightly purple colonies were all non-lactose fermenters. In addition all 51 slightly purple colonies are pyocyanin producers suggesting that they belong to P*seudomonas aeruginosa*. As a result, it is reasonable to select *P. aeruginosa* on HiCrome *Acinetobacter* Agar as it resists the antibiotics added in the medium for selection of *A. baumannii*. Interestingly, the 35 light purple oxidase negative isolates also

differed in their ability to ferment lactose. Our results have showed that 23/35 (65.7%) were lactose fermenters. Excluding these isolates from our previous isolation percentage decreased the isolation rate to 14.4% when MacConkey agar is used as a second layer for identification.

The results from molecular identification using 16S rRNA sequencing showed that 11 light purple (oxidase negative, non-lactose fermenters) and the single light yellow colony (oxidase negative, non-lactose fermenter) were identified as *A. baumannii*, while one colony (oxidase negative and non-lactose fermenter) has been identified as *Morganella morganii*. This reduces the isolation rate to 13.3% and shows that only 16S rRNA gene sequencing may provide accurate identification for *A. baumannii*. However, the 23 light purple colonies detected on HiCrome *Acinetobacter* Agar were found to be non-Acinetobacter isolates. These colonies are also oxidase negative but fermented lactose. 16S rRNA sequencing for some representatives revealed that these colonies belonged to enterobacteriaceae species including Esherichia coli, Enterobacter spp., and *Klebsiella pneumoniae*. Furthermore, diagnosis of the slightly dark purple colonies by 16S rRNA sequencing showed that these isolates belonged to *P. aeruginosa* which has a higher isolation rate (56.7%) compared to *A. baumannii*. This suggests that HiCrome *Acinetobacter* Agar could be used as a selective and differential media for the isolation of P. aeruginosa from clinical specimens.

Antibiotic resistance of the *A. baumannii* isolates have been tested for the resistance to 12 antibiotics. The results have showed that 100% of *A. baumannii* isolates are multi-drug resistant (MDR). In order to study the genes located on *A. baumannii* plasmids, genetic transformation has been conducted. The heat-shock method successfully transformed *E. coli* DH5α with plasmids from *A. baumannii* strains, transferring the resistance to seven antibiotics out of 11 tested in the transformation experiment. The transformed colonies showed identical MIC values to their wild type counterparts, except for amikacin, where the transformed *E. coli* DH5α had a lower MIC. This suggests additional mechanisms in *A. baumannii*, beyond plasmid-borne resistance genes, contributing to amikacin resistance. All transformed colonies have exhibited

uniform antibiotic resistance patterns, indicating that resistance has been originated from a single plasmid.

PCR used to identify seven plasmid-mediated antibiotic resistance genes in the genome of *A. baumannii*. No quinolone (*qnrA*, *qnrB*, and *qnrS*) and colistin (*mcr-1*) resistance genes have been found. However, all isolates carried *aac(6')* gene which can modify the effect of quinolones, particularly ciprofloxacin. The study also finds that all *A. baumannii* isolates, contained the $bla_{OXA\text{-}51}$ and *folA* genes, which encodes OXA-type carbapenemase and trimethoprime resistance, respectively.

الخلاصة

تم جمع مائة وسبعين عينة من مستشفيات الموصل/ العراق. وشملت العينات ٣٤.١٪ حروق، ٢٩.٤٪ ادرار، ٢٢.٣٪ جروح، ١١.٧٪ قشع، و٤.١٪ عينات للسائل الدماغي الشوكي. من بين ١٧٠ عينة، ٩٠ عينة اظهرت نموًا على HiCrome *Acinetobacter* Agar.

بكتريا *Acinetobacter baumannii* على HiCrome *Acinetobacter* Agar يجب أن تظهر على شكل مستعمرات صفراء إلى بنفسجية فاتحة بينما تمنع جميع أنواع البكتيريا الأخرى. إلا أن الدراسة الحالية أظهرت أن المستعمرات ظهرت مستديرة ومخاطية واختلفت في لونها. ظهرت معظم المستعمرات باللون البنفسجي (٣٥ بنفسجي فاتح و ٥١ بنفسجي داكن قليلاً), أما الأربع عزلات المتبقية فكانت ٣ بيضاء وواحدة صفراء, مما يشير إلى أن ٩٦.٦٪ من العزلات تنتمي إلى *A. baumanni*i. أما. ولم يتم ذكر الفرق في لون المستعمرة في التعليمات المقدمة من شركة Himedia بخصوص HiCrome *Acinetobacter* Agar. ولذلك تم إخضاع المزيد من التعريف للتعرف على العزلات التي تم الحصول عليها.

أظهر الفحص المجهري للعزلات أن جميع العزلات كانت سلبية لصبغة كرام، إلا أن الفحص المجهري حدد المستعمرات البيضاء بأنها *Candida* spp. يُعتقد أن نمو المستعمرات البيضاء على HiCrome *Acinetobacter* Agar يرجع إلى عدم فعالية المضادات الحيوية البكتيرية في الوسط تجاه Candida spp. بالإضافة إلى عدم وجود مضادات الفطريات الأخرى. تم بعد ذلك إخضاع المستعمرات لاختبار الأكسيداز، مع العلم أن *A. baumanni*i سلبيه تجاه الأكسيداز. أظهرت النتائج أن ٣٥ مستعمرة بنفسجيه فاتحة كانت سلبية تجاه الأكسيداز، بينما كانت ٥١ مستعمرة بنفسجيه داكنة قليلاً إيجابية تجاه الأكسيداز. من ناحية أخرى، كانت المستعمرة ذات اللون الأصفر الفاتح أيضًا سلبية للأكسيداز. أدى استخدام أوكسيديز إلى خفض معدل عزل *A. baumannii* من ٩٥.٥٪ إلى ٣٨.٩٪. وهذا تراجع كبير

بالنسبة لأجار HiCrome *Acinetobacter* عند استخدامه بمفرده للتعرف على *A. baumanni*.

للتمييز بين *A. baumannii* ومخمرات اللاكتوز التي تنتمي إلى البكتيريا المعوية enterobacteriaceae، تمت زراعة جميع البكتيريا المعزولة على أجار ماكونكي. أظهرت النتائج أن العزلة الصفراء الفاتحة المفردة كانت غير متخمرة للاكتوز وأن جميع المستعمرات الـ ٥١ ذات اللون البنفسجي الداكن كانت غير متخمرة للاكتوز أيضًا. بالإضافة إلى ذلك، كانت جميع المستعمرات الـ ٥١ ذات اللون البنفسجي الداكن منتجة للبيوسيانين، مما يشير إلى أنها تنتمي إلى بكتيريا . *Pseudomonas aeruginos*a ونتيجة لذلك، فمن المعقول تحديد *P. aeruginosa* على أجار HiCrome *Acinetobacter* لأنه يقاوم معظم المضادات الحيوية المضافة في الوسط (الأمبيسيلين والسيفتازيدين) لاختيار *A. baumannii*. ومن المثير للاهتمام أن العزلات السلبية للأكسيداز ذات اللون البنفسجي الفاتح والبالغ عددها ٣٥ عزلة اختلفت أيضًا في قدرتها على تخمير اللاكتوز. أظهرت نتائجنا ان ٢٣/35

(65.7%) كانت مخمرة للاكتوز. أدى انخفاض معدل العزل إلى ١٤.٤٪ عند استخدام أجار ماكونكي كفحص ثانيي لتحديد النوع.

نتائج التعرف الجزيئي بواسطة تسلسلات ١٦SrRNA من العزلات المختارة, أظهرت أن ١١ عزلة بنفسجية فاتحة (سلبية أوكسيديز، غير مخمرة للاكتوز) ومستعمرة صفراء فاتحة واحدة (سلبية أوكسيديز، غيرمخمرة للاكتوز) تم تحديدها على أنها *A. baumannii*، في حين تم تحديد مستعمرة واحدة (سلبية أوكسيديز، غيرمخمرة اللاكتوز). تم تحديدها على أنها *Morganella morganii*. وهذا يقلل من معدل العزل إلى ١٣.٣٪ ويظهر أن ١٦ SRNA فقط قد يوفر تحديدًا دقيقًا لـ *A. baumannii*. ومع ذلك، تم العثور على ٢٣ مستعمرة بنفسجيه فاتحة تم اكتشافها على أجار HiCrome *Acinetobacter* وهي معزولة من غير *Acinetobacter*. كانت هذه المستعمرات أيضًا سلبية للأكسيداز ولكن مخمره للاكتوز المخمر. كشف ١٦ SRNA أن هذه المستعمرات تنتمي إلى أنواع البكتيريا المعوية بما في ذلك *Esherichia coli*, *Enterobacter* spp., و*Klebsiella pneumoniae*. علاوة على ذلك، أظهر تشخيص المستعمرات البنفسجية الداكنة قليلاً بواسطة تسلسل

١٦S rRNA أن هذه العزلات تنتمي إلى *P. aeruginosa* التي لديها نسبة عزل أعلى (٥٦.٧%) مقارنة بـ *A. baumannii*. يشير هذا إلى أنه يمكن استخدام أجار HiCrome Acinetobacter كوسيلة انتقائية وتفاضلية لعزل *P. aeruginosa* من المصادر السريرية.

تم اختبار مقاومة عزلات *A. baumannii* للمضادات الحيوية لـ ١٢ مضادًا حيويًا. أظهرت النتائج أن ١٠٠٪ من عزلات *A. baumannii* كانت مقاومة للأدوية المتعددة (MDR).

من أجل دراسة الجينات الموجودة على بلازميدات A. baumannii، تم إجراء التحول الجيني. نجحت طريقة الصدمة الحرارية في تحويل *E.coli* DH5α بالبلازميدات من سلالات *A. baumannii*، مما أدى إلى نقل المقاومة إلى سبعة مضادات حيوية من أصل ١١ تم اختبارها في تجربة التحول. أظهرت المستعمرات المحولة قيم MIC متطابقة مع نظيراتها من النوع البري، باستثناء الأميكاسين، حيث كان لدى *E. coli* DH5α المحولة MIC أقل. يشير هذا إلى وجود آليات إضافية في *A. baumannii*، تتجاوز جينات المقاومة التي تحملها البلازميد، مما يساهم في مقاومة الأميكاسين. أظهرت جميع المستعمرات المتحولة أنماط مقاومة موحدة للمضادات الحيوية، مما يشير إلى أن المقاومة نشأت من بلازميد واحد.

تم استخدام تفاعل البوليميراز المتسلسل لتحديد سبعة جينات مقاومة للمضادات الحيوية بوساطة البلازميد في جينوم *A. baumannii*. لم يتم العثور على جينات مقاومة الكينولون (*qnrA*، *qnrB*، و*qnrS*) والكوليستين (*mcr-1*). ومع ذلك، حملت جميع العزلات جين ('aac6) الذي يمنح مقاومه الكينولونات، وخاصة السيبروفلوكساسين. ووجدت الدراسة أيضًا أن جميع عزلات *A. baumannii* تحتوي على جينات bla_{OXA-51} و*folA*، التي تشفر كاربابينيماز من نوع OXA ومقاومة تريميثوبريم، على التوالي.

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة الموصل

كلية العلوم

قسم علوم الحياة

كفاءة وسط HiCrome *Acinetobacter* Agar في تشخيص بكتريا *Acinetobacter baumannii* من مصادر سريرية ودراسة خصائص بلازميداتها

رسالة تقدمت بها الطالبة

نسرين عبدالله فتحي محمود النعيمي

إلى

مجلس كلية العلوم في جامعة الموصل وهي جزء من متطلبات نيل

شهادة الماجستير في اختصاص

علوم الحياة / احياء مجهرية

بإشراف