****Ministry of Higher Education and Scientific Research

University of Al-Qadisiya

College of Education

**Bacteriological and Molecular Study of Neonatal Infection in Al-Hilla City**

**A Thesis**

**Submitted to the Council of the College of Education, University of Al-Qadisiya in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctorate of Philosophy in Microbiology**

**By**

**Amal Talib Atiyah Alsa'ady**

**B. Sc/ Biology / 1994**

**M.Sc./ Microbiology / 2003**

**Supervised by**

**Professor**

**Dr. Habeeb S. Naher**

**College of Medicine \ Babylon University**

**2015 A.D 1435 A.H**

**Summary**

Throughout this study, a total of 666 samples were collected from different sites of neonates, mothers and hospital environmente. Out of these, 490 samples were collected from both sexes neonates who ranged in age between one to ninety days that were admitted to the Preterm Unit and Neonatal Intensive Care Unit (NICU) in Babylon Hospital for Pediatric and Gynecology during the period of 12 months from first of March 2012 to twenty eight of February 2013. Neonatal samples included Blood, Urine, CerebroSpinal Fluid and swabs from many different sources( Oral Cavity, Umbilical Cord, Skin, Eye, Respiratory Secretions, Nose and Surgical Wounds). Atotal of 74 samples were collected from pregnant women and mothers in delivery room, included Amniotic Fluid, High Vaginal Swabs(HVS) And Umbilical Cord Blood. Moreover, 102 samples were collected from hospital environment included swabs from Mask of Ventilators, Cannulae, Caesarian Section Theatre, Nursery, Curttage Unit, Floor of Delivery Room, Stage of Delivery Room, Disinfectant, Fluid Sucker and Catheter.

Out of these 666 samples, 403(61%) samples yielded bacterial growth included 334(68%) of neonatal samples, 40(54%) of samples from mothers and 29(28%) of environmental samples. While 263(39%) samples showed no bacterial growth.

Routs of etiologic bacteria of neonatal infections included Intrautrin, Intrapartum and Nosocomial Infections. Transmission from mother was the most common rout with 56 isolates. Distribution of bacterial types obtained from mothers was 30.4% Gram negative and 69.6% Gram positive bacteria.

Gram negative bacteria were the more frequent isolates 284(56%) than Gram positive 226(44%). *Pseudomonas aeruginosa* was most frequently isolated bacteria(19.7%), followed by *Klebsiella pneumoniae* (15.8%). While for Gram positive bacteria, Staphylococci were the predominant and *Staphylococcus aureus* was found to be the most frequent recording 38.2%.

Many risk factors were studied. 43% of neonates were preterm, 31% Low Birth Weight, 68% Male, 49% With Early Onset infection, and 68% with Normal Vaginal Delivery. In addition to Maternal Background.

Antibiotic sensitivity test by disc diffusion method revealed that most isolates were resistant to penicillins and cephalosporins with 100% resistance for cephalothin. While 100% sensitivity was shown in each Imipenem(IPM) and Meropenem(MRP) for both Gram negative and Gram positive bacteria. On the other hand, most other antibiotics revealed avariable levels in resistance according to the type of bacteria.

The results demonstrated that, among Gram negative bacteria, most types revealed high levels of resistance against most antibiotics: >70%Ampicillin(AMP), >70%Rifampicin(RIF), >60%Carbencillin(CB), >60%Amoxiclave(AMC), and >50%Trimethoprime(TMP). *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumonia*e have highest levels of resistance for most antibiotics with multi-drug resistance.

In Gram positive bacteria, 100% resistance was shown to Amoxiclave. Most types of these bacteria revealed high levels of resistance against two antibiotics, >80% Amoxiclave(AMC) and >70% Ceftazidime(CAZ), while low levels (0-20%) were recorded in Ciprofloxacin(CIP), Norfloxacin(NX), Rifampicin(RIF), Chloramphenicol(C) and Clindomycin(DA).  *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* have highest levels of resistance for most antibiotics with multi-drug resistance.

The results of Minimum Inhibitory Concentrations(MIC) by using HiComb test showed that *Pseudomonas aeruginosa* has 100% resistance for Amoxiclave with MIC values ranged between 4-240μg/ml, followed by 70% resistance for Chloramphenicol with MIC values ranged between 4-120 μg/ml. whereas *Staphylococcus aureus* has 100% resistance for both Methicillin and Oxacillin with MIC values ranged between 5-240μg/ml and 32-256μg/ml respectively. While 0% resistance reported in Vancomycin with MIC values ranged between 0.024-0.512μg/ml.

Molecular detection by PCR was performed to detect the presence of responsible genes of resistance for several antibiotics. The results demonstrated that among 35 isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, highest incidence was 51.4% for *arr-2* gene (for Rifampicin resistance) followed by 49% *aac(3)I*( for Gentamicin resistance) and 37% *blaCARB* (for Carbenicillin resistance). The distribution of these genes varied in respect to the isolation source*.* On the other hand, among 35 *Staphylococcus aureus* isolates were determined previously as MRSA by phenotypic methods, 91.4% have *mecA* gene( for Methicillin resistance). followed by 37% have *nuc gene* ( for identification of *Staphylococcus aureus*) and 2.9% have *vanA*( for Vancomycin resistance). The distribution of these genes varied in respect to the isolation source*.*

الخلاصة

تم في هذه الدراسة جمع 666 عينة مختلفة من مستشفى بابل التعليمي للولادة والأطفال خلال مدة سنة واحدة (من 1- آذار 2012 ولغاية 30- شباط 2013). توزعت العينات على ثلاثة مجاميع: المجموعة الأولى شملت 490 عينة جمعت من الأطفال الخدج وحديثي الولادة الراقدين في وحدات الخدج(الخدج المنزلي والخدج المعقم) ووحدة الأنعاش والذين تراوحت أعمارهم مابين 1-90 يوما ومن كلا الجنسين. هذه العينات شملت الدم, الأدرار, سائل النخاع الشوكي ومسحات مختلفة من جسم الطفل و حسب حالة الاصابة ( الفم,الحبل السري, الجلد, العين, افرازات الجهاز التنفسي, الأنف وجروح العمليات الجراحية). المجموعة الثانية شملت 74 عينة جمعت من الأمهات وشملت مسحات مهبلية من النساء الحوامل ,عينات السائل الأمنوسي من الأمهات داخل صالة الولادة, دم الحبل السري من الأطفال المولودين حديثا في صالة الولادة؛ المجموعة الثالثة شملت 102 عينة بيئية جمعت من مواقع مختلفة من بيئة المستشفى تضمنت مسحات من كمامة جهاز الأستنشاق الكهربائي, الكانولا, صالة العمليات القيصرية, حاضنة الخدج, وحدة الكورتاج, الأرضية والسرير في صالة الولادة, المطهرات, جهاز سحب السوائل وأخيرا القثاطر.

من بين 666 عينة, 403(61%) عينة اعطت نمو بكتيري وتوزعت بين: 334(68%) عينات أطفال؛ 40(54%) عينة أمهات و 29(28%) عينة بيئية. بينما 263(39%) لم تعطي نموا.

تم خلال الدراسة عزل وتشخيص 510 عزلة بكتيرية حيث سادت البكتريا السالبة لصبغة غرام بنسبة 284(56%) على البكتريا الموجبة 226(44%) ومن بين الانواع البكتيرية السالبة احتلت بكتيريا الزوائف الزنجارية الصدارة بنسبة 19,7% تلتها بكتيريا الكلبسيلا نيمونيا 15,8% في حين كانت المكورات العنقودية هي السائدة من بين البكتريا الموجبة لصبغة غرام وكانت العنقوديات الذهبية هي السائده بينها أذ سجلت 38,2% .

تعددت مصادر الأصابات البكتيرية للأطفال حديثي الولادة فمنها اصابات داخل الرحم وأخرى خلال الولادة وثالثة تكتسب بعد الولادة كعدوى المستشفيات. وفي هذا البحث كانت الأم هي المصدر الأكثر شيوعا لهذه الأصابات أذ تم الحصول على 56 عزلة من الأمهات توزعت بين 30,4% سالبة لصبغة غرام و 69,6% موجبة لصبغة غرام.

تناولت هذه الدراسة العديد من عوامل الخطورة التي تزيد من أحتمالية حدوث أصابات الأطفال حديثي الولادة ومنها الخداجة, انخفاض الوزن عند الولادة, الجنس, وقت حدوث الأصابة, طريقة الولادة والحالة الصحية للأم خلال الحمل والولادة. وقد تبين أن الخداجة هي العامل الأكثر تأثيرا.

أظهرت نتائج أختبارات الحساسية للمضادات الحيوية أن معظم الأنواع البكتيرية السالبة والموجبة لصبغة غرام أمتلكت مقاومة عالية 100% للبنسلينات والسيفالوسبورينات بينما أعطت حساسية تامة 100% لمضادات الأميبينيم والميروبينيم في حين تباينت المقاومة لأنواع المضادات الأخرى حسب نوع البكتريا. وسجلت اعلى مستويات المقاومة ضد أغلب المضادات الحيوية من قبل الزوائف الزنجارية والكلبسيلا نيمونيا من بين الأنواع السالبة لصبغة غرام والعنقوديات الذهبية والمكورات المعوية البرازية من بين الأنواع الموجبة لصبغة غرام.

لقد تبين من خلال نتائج أختبار التركيز المثبط الأدنى للمضادات الحيوية MIC أن الزوائف الزنجارية امتلكت مقاومة 100% للأموكسيكليف بقيم بين 4-120 مايكروغرام في حين أمتلكت العنقوديات الذهبية مقاومة 100% لكل من المثيسلين والأوكساسلين بقيم بين 5-240 مايكروغرام؛ 32-256 مايكروغرام على التوالي بينما كانت حساسة 100% تجاه الفانكومايسين.

تم التحري جزيئيئا عن بعض الجينات المسؤولة عن المقاومة تجاه عدد من المضادات الحيوية وقد كشفت النتائج أن من بين 35 عزلة للزوائف الزنجارية هناك 51,4% تمتلك الجين *arr-2* المسؤول عن المقاومة للريفامبسين؛ 48,6% تمتلك الجين *aac(3)I*  المسؤول عن المقاومة للجنتامايسين و 37,1% تمتلك الجين *blaCARB* المسؤول عن المقاومة للكاربنسيلين. ومن بين 35 عزلة للعنقوديات الذهبية هناك 91,4% تمتلك الجين *mecA* المسؤول عن المقاومة للمثيسلين؛ 37,1% تمتلك الجين *nuc* ؛ وأخيرا 2,9% تمتلك الجين *van*A المسؤول عن المقاومة للفانكومايسين.