جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي
والبحث العلمي
جامعة ديالى
كلية العلوم

انتشار البكتريا السالبة لملون غرام في القناة التناسلية الانثوية مع دراسة جزيئية للعزلات المتعددة المقاومة للمضادات الحياتية

رسالة

مقدمة الى مجلس كلية العلوم جامعة ديالى كجزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة

من قبل الطالب
زهير حسن علوان
بكالوريوس كلية العلوم قسم التقنيات الاحيائية جامعة بغداد
(2005)

اشراف
ا.م.د مثنى عبدالقادر صالح المهداوي

2020م 1442هـ

Introduction

Bacterial vaginosis(BV) is a complex vaginal flora shift in which normal hydrogen peroxide (H_2O_2) producing by *Lactobacillus* species reduces and, anaerobic pathogens e.g. *Prevotella* sp., *Peptostreptococcus* sp .,*Mobiluncus* sp. *Gardnerella vaginalis* and *Mycoplasma hominis* overgrowth(Keane *et al.*, 2000).

Some bacteria play very important homeostatic roles that can contribute to unhealthy conditions due to their absence. Long recognized as the predominant bacterial flora of the lower female genital tract , *lactobacilli* strengthen the defense against colonization by opportunistic pathogens(Smith and Ravel, 2017).

The true prevalence and causes of BV remain unclear, however it can partially due to the disorder is auto-diagnosed and self-treated excessively often. Additionally, BV is sometimes asymptomatic or has more than one cause. Experts estimate the prevalence of bacterial vaginosis that up to 22% - 50%. (Sobel, 1997).

Most women who are symptomatic complain about discharge and an unpleasant odor such as fishy-smelling that is more noticeable after unprotected intercourse. The explanation that the odor is more apparent after unprotected sex is because the alkaline semen raises amine volatilization in the same way that potassium hydroxide (KOH) in the whiff test creates a fishy odour. Odour and discharge are two of four diagnostic tools Amsel uses to diagnose BV in its clinical composite criteria(Amsel *et al.*, 1983).

The vagina acts as a natural habitat in a healthy state by providing optimal temperature, moisture, pH, and nutrient conditions that contribute to the growth of the usual commensal vaginal flora. The vagina acts to and from the upper genital tract as a conduit. The natural flora has an extremely important role to play in avoiding infections and complications (Munjoma, 2004).

Epidemiological studies indicate BV association with significant adverse complications. women with BV are at increased risk of pelvic inflammatory disease (Brinton *et al.*, 2017). Pregnant women with BV are at risk for early membrane rupture, premature labor (Barnhill *et al.*, 1995) , and increased prevalence of sexually transmitted infections such as *Neisseria gonorrhoeae*(Ness *et al.*, 2005), as well as *Trichomonas vaginalis*(Masha *et al.*, 2017), and human immunodeficiency virus (Cohen *et al.*, 2012).

Diverse methods for diagnosing BV are now available. These are included wet and dry microscopy, culture, Amsel's criteria, the traditional and reference approach for the diagnosis of BV, and Nugent criteria were the BV diagnostic gold standard.

The emergence and spread of Gram-negative bacteria resistant to antibiotics across global healthcare networks present a major challenge to public health; because the number of effective antibiotics available to treat these resistant organisms is diminishing, it is important that we establish more effective strategies to control their proliferation (Hawken and Snitkin, 2020).

Due to the limited number of studies on this problem, we decided to study the prevalence of gram-negative bacteria as causative agents of bacterial vaginosis, aiming to evaluate the epidemiological of gram-negative bacterial vaginosis in healthcare-associated settings and in the community, and estimate the prevalence of Multi-drug-resistant (MDR) isolates. By the following steps

1-Determine the prevalence of gram-negative bacterial infections in accordance with global standards, and characterize its sensitivity to antibiotics, and determine the MDR isolates.

2- Screening the isolates producing ESBLs and MBLs β-Lactamase enzymes.

3-Study the spreading of two β-Lactamase resistance genes including *bal* $_{SHV}$ gene and *bal* $_{NDM}$ gene in Multi-drug-resistant (MDR) isolates.

الـخـلاصـــة

أجريت هذه الدراسة خلال الفترة من أكتوبر 2019 إلى مارس 2020. إجمالي 520 من النساء الحوامل 338 (65٪) و غير الحوامل 182 (35٪), تم اخذ عينات من المريضات تضمنت مسحات مهبلية عالية لكل امرأة ، تراوحت أعمارهن بين (13-59) سنة (Mean) 27.80 ± SD 7.19) من اللواتي راجعن العيادة الخارجية لأمراض النساء والتوليد في مستشفى البتول التعليمي لأمراض النسائية والأطفال في ديالى . تم جمع المسحات المهبلية ,وتحديد نسبة انتشار التهاب المهبل البكتيري وفق ثلاث معايير عالمية تضمن معيار امسل بنسبة انتشار (25.38%) ومعيار نوغنت بنسبة انتشار (33.65%) ومعيار الزرع على الاوساط الزرعية بنسبة انتشار (29.03%) وتم إجراء الفحص المجهري المباشر(الرطب) وتم استخدام الاوساط الانتقائية والتفريقية لعزل البكتريا السالبة لملون غرام. تم تشخيص الكائنات الحية الدقيقة المعزولة باستخدام الفحص المجهري والفحوصات البايوكيميائية ،وتم تأكيد العزلات السالبة لملون غرام بواسطة نظام Vitek 2. تم إجراء اختبار حساسية المضادات الحيوية لعزلات البكتيريا السالبة لملون غرام باستخدام طريقة نشر القرص (كيربي باور). تم استخدام 14 مضاد حيوي للميكروبات التي تنتمي إلى 11 عائلة من المضادات الحيوية تم تحديدها وفقًا للمضادات الحيوية الموصى بها من قبل (CLSI,2019) للبكتريا السالبة لملون غرام.

أظهرت النتائج أن العدد الكلي للنمو الموجب 207 (39.80٪) من مجموع 520 عينة سريرية وكان توزيع النمو الميكروبي لـ 207 عينة كالتالي: **أولاً** 151 (29.03٪)عزلة بكتيرية من جميع العينات السريرية و (72.94٪) من العينات السريرية موجبة النمو. مجموع عينات النمو الموجب ؛ تضمنت 69 عزلة سالبة لملون غرام (33.33٪) تضمنت العزلات التالية الاشريشيا القولونية والكلبيسلا الرئوية والزائفة الزنجارية. **ثانيا** 77 (37.19٪) عزلة أظهرت نموا موجبا للكانديدا. توزعت بواقع 56 عزلة (72.72٪) منفردة النمو ، بينما كان النمو المختلط مع بكتيريا سالبة الجرام في 8 عزلات (10.38٪) ونمو مختلط مع بكتريا موجبة الجرام كان 13 عزلة (16.88٪).

اظهرت نتائج عزلات البكتيريا السالبة لملون غرام 69 عزلة موزعة على 34 (49.27٪) عزلة من نساء حوامل و 35(50.72٪)من نساء غير حوامل . تم الكشف عن عزلات MDR من مجموع 69 عزلة سالبة لملون غرام, حيث كشف وجود 55 عزلة (79.71٪) مطابقة لتعريف المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية ، توزعت العزلات البكتيرية

سالبة لملون غرام بنسبة (89.47٪) لعزلات الاشريشيا القولونية و (73.91٪) لعزلات الكلبسلا الرئويةو (50٪) لعزلات الزائفة الزنجارية.

تم فحص جميع العزلات البكتيرية سالبةلملون غرام (69)عزلة لمعرفة قدرتها على إنتاج إنزيمات β- lactamases واسعة الطيف الممتد باستخدام الاوساط الزرعية الانتقائية. وكانت(56.52٪) منتجة لـ ESBLs. وكان توزيع العزلات السالبة لملون غرام المنتجة لانزيمات β- lactamases الطيف الممتد الاشرشيشا القولونية (55.26٪) والكلبسلا الرئوية (52.17٪) والزائفة الزنجارية (62.59)٪.

تم استخدام اختبار القرص المدمج Imipenem-EDTA لتحديد العزلات المنتجة لـ MBL, الكشف عن النمط الظاهري Metalo beta lactmase من العزلات البكتيرية سالبة لملون غرام واظهرت النتيجة غيابا تاما للنمط الظاهري ل Metalo beta lactmase في جميع العزلات. تم فحص جميع عزلات MDR لجين المقاومة ، bal_{SHV} بواسطة اختبار PCR باستخدام بادئات متخصصة. أظهرت العزلات انتشار جين bal_{SHV} (26.47)٪ والذي تم توزيعه بنسبة (37.5)٪ من عزلات الاشريشيا القولونية و(82.35٪) من عزلات الكلبسلا الرئوية و(25٪)من عزلات الزائفة الزنجارية. تم فحص جميع عزلات MDR لجين المقاومة ، bal_{NDM} بواسطة اختبار PCR باستخدام بادئات متخصصة, أظهرت العزلات انتشار الجين bal_{NDM} بنسبة (4.34)٪ والتي توزعت على عزلات الاشريشيا القولونية7.89) ٪.(والكلبسلا الرئوية بنسبة (0٪) والزائفةالزنجارية بنسبة (0٪).