



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

كلية التربية للعلوم الصرفة

التنوع الوراثي للمحفظة في بكتريا *Klebsiella pneumoniae* متعددة المقاومة للمضادات الحيوية واختبار تأثير دقائق اوكسيد الزنك النانوي عليها

اطروحة مقدمة

إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة بجامعة ديالى جزءاً من متطلبات نيل درجة دكتوراه
فلسفة في علوم الحياة

من قبل

صبا جاسم جواد الزبيدي

بكالوريوس علوم حياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى 2003

ماجستير احياء مجهرية / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى 2007

بإشراف

أ.د. هادي رحمن رشيد الطائي

2020م

1442هـ

المقدمة introduction

تعد بكتريا *Klebsiella pneumoniae* احد أهم أنواع جنس بكتريا *Klebsiella* وهي عصيات سالبة لصبغة كرام (Gram – negative)، مخمرة لسكر اللاكتوز (Fermented Lactose)، غير متحركة (Non motil)، لا هوائية إختيارية (Facultative anaerobic) وتحتوي على المحفظة (Capsule) (Ryan و Ray ، 2014).

توجد بكتريا *K.pneumoniae* بشكل طبيعي في الجهاز الهضمي للإنسان و تستطيع أن تسبب العديد من الأخماج الأنتهازية (Opportunistic infection) كإصابات مكتسبة من المستشفيات (Nosocomial infection) مثل التهاب المسالك البولية (Urinary tract infection) والالتهاب الرئوي (Pneumonia) وتجرثم الدم (Bacterimia) وخراج الكبد القيحي (Purulent liver abscess) والإسهال (Diarrhea) وعدوى الجروح (Wounds) والحروق (Burns) لذا يمكن عزلها من مصادر مرضية مختلفة (Falih و آخرون، 2016).

تمتلك بكتريا *K.pneumoniae* العديد من عوامل الضراوة التي تجعلها قادرة على غزو الجسم واحداث المرض فهي تمتلك محفظة سميكة (Capsule) من متعدد السكريات والاهداب (fimbriae) وأنظمة نقل الحديد (Siderophores) ومتعدد السكريد الشحمي (Lipopolysaccharide) والتي تُعد سمومًا داخلية (Endotoxin) (Aher وآخرون ، 2012).

وتعد المحفظة واحدة من أهم عوامل الضراوة التي تمتلكها هذه البكتريا فهي المسؤولة عن اظهار شكل المستعمرات ذات القوام المخاطي (mucoid) اللامع على سطح الاكار، و أن المحفظة تساعد على تثبيط عملية البلعمة (phagocytosis) وتمنع ارتباط المتمم مع غشاء الخلية البكتيرية (Cortes وآخرون، 2002)، يساعد وجود متعدد السكريات المحفظي (CPS) (Capsular polysaccharide) على الأستعمار البكتيري وتشكيل الغشاء الحيوي (Biofilm) (Chiu وآخرون، 2013).

تكون مادة متعدد السكريات المحفظي capsalar polysaccharide (CPS) في المحفظة بشكل حزم سميكة من الهياكل الليفية المحيطة بسطح الخلية البكتيرية لحمايتها عن طريق

تنشيط عملية البلعمة ويعتمد التركيب الحيوي لمتعدد السكريات المحفظي (CPS) على جينات متعددة يتم تنظيم ونقل وتجميع المتعدد السكريات المحفظي (CPS) على سطح البكتريا بواسطة البروتينات المشفرة بواسطة الجينات المحفوظة وهي *wzi* ، *orf 2* ، *gal F* ، *wzb* ، *wza* ، *wzc* والتي توجد في نهاية 5~ من *cps* (Pan وآخرون، 2015). أن الأختلاف في تسلسل النيوكليوتيدات وعدد الجينات يكمن وراء الأختلافات في أنواع المحفظة لبكتريا *K.pneumoniae* (Shu وآخرون، 2009). وتعد بكتريا *K.pneumoniae* التابعة للنمطين K1 و K2 مسؤولة عن معظم الامراض المكتسبة (Nosocomial) في المستشفيات مثل اصابات القناة التنفسية وخراج الكبد القيحي (Sturv وآخرون، 2015).

تكون جينومات بكتريا *K.pneumoniae* متنوعة للغاية وتختلف السلالات بعضها عن بعض بنسبة 0.5% باختلاف النيوكليوتيدات (Holt وآخرون، 2015) ويتكون جينوم بكتريا *K.pneumoniae* عادة من (5000–6000) جين يتكون من مجموعة من الجينات التي توجد في جميع أنواع هذه البكتريا وهي الجينوم الأساسي (Core genome)، ومما يجدر الإشارة إليه أن غالبية الجينوم يتكون من جينات اضافية (Accessory genome) وتشمل الجينات المحمولة كروموسومياً وجينات البلازميدات وتحدث الجينات الإضافية بسبب انتقال الجينات افقياً (Horizontal gene transfer) و يتضح وجود الجزر الجينومية (Genomic islands) والعناصر الجينية المنقلة (Mobile genetic elements) وتساعد الجينات المشفرة في الجزر الجينية الامراضية البكتريا على التكيف مع مواقع معينة من العدوى (Infection) او الأستعمار (Colonization)(VanAartsen وآخرون، 2012)، و أن هناك العديد من الجينات المسؤولة عن تكون المحفظة والتي منها *cps* ، *magA* ، *rmpA* ، K1 ، K2 (Lin وآخرون، 2012).

أدى الأستخدام الواسع للمضادات الحيوية Antibiotic لعلاج بكتريا *K.pneumoniae* الى تطوير مقاومة البكتريا لمعظم او جميع المضادات الحيوية الشائعة الأستخدام والتي اصبحت مشكلة عالمية في الطب الحديث (Navon – Venezia وآخرون، 2017) لذلك ظهرت بكتريا *K.pneumoniae* متعددة المقاومة (Multidrug resistant)(MDR) والتي اصبحت كمصدر

رئيساً للعدوى المكتسبة من المستشفيات ذات معدلات إصابة عالية بسبب محدودية خيارات العلاج (Watkins و Bonomo ، 2016).

إن تراكم جينات المقاومة للمضادات الحيوية في بكتريا *K.pneumoniae* عن طريق نقل الجينات الأفقي (HGT) (Horizontal gene transfer) والطفرات الوراثية (Mutation) أدى الى ظهور بكتريا *K.pneumoniae* قادرة على انتاج انزيمات البيبتالاكتاميز واسعة الطيف (ESBL)(Extended spectrum β -Lactamase) وانزيمات البيبتالاكتاميز المعدنية (Metallo β -lactamase)(MBL) بشكل واسع (Livermore و Yuan ، 2004).

وبسبب ظهور المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية من قبل بكتريا *K.pneumoniae* توجب البحث عن بدائل اخرى غير المضادات الحيوية للقضاء على هذه البكتريا وهذا ما دفع العلماء الى استخدام الدقائق النانوية (Nanoparticles) وهي مواد ذات احجام نانوية والتي تمتلك تأثيراً كبيراً على مكونات الخلية البكتيرية (Roy وآخرون، 2010) ومن هذه المواد النانوية هي أكسيد الزنك و أكسيد التيتانيوم والنحاس والكوبلت والفضة والذهب (Sathiyavimal و آخرون، 2018).

ويعد قياس التعبير الجيني (Gene expression) لبعض الجينات لبكتريا *K.pneumoniae* والتي قد عوملت بوحدة من المواد النانوية احدى طرق التأكد من تأثير هذه المواد على عمل الجينات البكتريا وتثبيطها، ويعرف التعبير الجيني على أنه العملية التي يتم من خلالها استخدام المعلومات الجينية لتصنيع منتجات جينية قد تكون بروتينات (يتم تصنيعها باستخدام معلومات mRNA) أو قد تكون أحد أنواع الأحماض النووية الريبوزية (tRNA, rRNA, snRNA) ويتضمن التعبير الجيني عمليتين هما الأستساخ Transcription والترجمة Translation. فقياس التعبير الجيني من التقنيات الحديثة التي لها تطبيقات عديدة في مجال البحوث الجزيئية ويتم فيه قياس قدرة المورثات على التعبير عن نفسها ويتم قياس التعبير الجيني باستخدام جهاز البلمرة المتسلسل الكمي اللحظي والذي يعرف بإسم Real time PCR (Brueckner وآخرون، 2009). وتعد تقنية تفاعل المتسلسل الكمي (qRT – PCR) (Quantitative real time polymerase chain reaction) المستخدمة لقياس مستويات

Summary الخلاصة

تم جمع (278) عينة سريرية من الذين كانوا يعانون من أمراض مختلفة وشملت العينات الإدرار (130) عينة والقشع (83) عينة والجروح (36) عينة والحروق (15) عينة الدم (14) عينة جمعت العينات للمدة من كانون الاول 2018 ولغاية آيار 2019 من مستشفى بعقوبة التعليمي / ديالى .

تم إخضاع جميع العينات الى الزرع البكتيري وقد أظهرت النتائج ان 175 (62.9%) عينة كانت موجبة للزرع البكتيري في حين أن 103 (37.1%) عينة كانت سالبة للزرع البكتيري، شخّصت العزلات باستخدام الطرق الميكروبيولوجية وتأكيد التشخيص باستخدام VITEK2 compact system وأظهرت النتائج أن 69 (39.4%) من العزلات كانت بكتريا *Klebsiella pneumoniae* إذ كانت في الإدرار 42 (32.31%) والقشع 17 (20.5%) والجروح 7 (19.44%) والحروق 2 (13.33%) والدم 1 (7.14%).

أظهرت نتائج إختبار فحص الحساسية أن عزلات بكتريا *K.pneumoniae* تمتلك مقاومة اتجاه مضادات مجموعة البييتالاكتام هي (Ampicillin 100% ، Piperacillin 81.16% ، Cefepime ، 72.46% ، Aztreoname ، 75.36% ، Amoxicillin +Clavulainc acid ، 71.01% ، Ceftazidime ، 62.32% ، Ceftriaxone ، 56.5% ، Imipenem ، 27.53% ، Meropenem 26.19%). بينما كانت مقاومتها اتجاه مضادات الأمينو كلايكوسيد ، إذ بلغت (Amikacin 47.82% ، Tobramycin 43.47% ، Gentamicin 36.23%) وكانت نسبة المقاومة لمضادات الكينولونات إذ قاومت (Levofloxacin 31.88% ، Ofloxacin 28.98% ، Ciprofloxacin 24.63%)، أما مضاد Trimethoprim – sulfamethoxazole فبلغت نسبة المقاومة 65.22% .

أظهرت نتائج إختبار حساسية المضادات الحيوية أن 18 (26%) من عزلات *K.pneumoniae* متعددة المقاومة (Multidrug resistance (MDR)، و بينت النتائج أن ست (8.7%) عزلات منها مقاومة لثلاث مجاميع من المضادات الحيوية (Extensive drug resistance (XDR) .

تم تحديد تركيز المثبط الأدنى (MIC) للعزلات قيد الدراسة باستخدام جهاز VITEK2 compact system ، تروحت قيمته (MIC) لمضاد Ampicillin (16 – 32) مايكروغرام/مل أما

Summary الخلاصة

تم جمع (278) عينة سريرية من الذين كانوا يعانون من أمراض مختلفة وشملت العينات الإدرار (130) عينة والقشع (83) عينة والجروح (36) عينة والحروق (15) عينة الدم (14) عينة جمعت العينات للمدة من كانون الاول 2018 ولغاية آيار 2019 من مستشفى بعقوبة التعليمي / ديالى .

تم إخضاع جميع العينات الى الزرع البكتيري وقد أظهرت النتائج ان 175 (62.9%) عينة كانت موجبة للزرع البكتيري في حين أن 103 (37.1%) عينة كانت سالبة للزرع البكتيري، شخّصت العزلات باستخدام الطرق الميكروبيولوجية وتأكيد التشخيص باستخدام VITEK2 compact system وأظهرت النتائج أن 69 (39.4%) من العزلات كانت بكتريا *Klebsiella pneumoniae* إذ كانت في الإدرار 42 (32.31%) والقشع 17 (20.5%) والجروح 7 (19.44%) والحروق 2 (13.33%) والدم 1 (7.14%).

أظهرت نتائج إختبار فحص الحساسية أن عزلات بكتريا *K.pneumoniae* تمتلك مقاومة اتجاه مضادات مجموعة البيبتالاكتام هي (Ampicillin 100% ، Piperacillin 81.16% ، Cefepime ، 72.46% ، Aztreoname ، 75.36% ، Amoxicillin +Clavulainc acid ، 71.01% ، Ceftazidime ، 62.32% ، Ceftriaxone ، 56.5% ، Imipenem ، 27.53% ، Meropenem 26.19%). بينما كانت مقاومتها اتجاه مضادات الأمينو كلايكوسيد ، إذ بلغت (Amikacin 47.82% ، Tobramicin ، 43.47% ، Gentamicin 36.23%) وكانت نسبة المقاومة لمضادات الكينولونات إذ قاومت (Levofloxacin 31.88% ، Ofloxacin 28.98% ، Ciprofloxacin 24.63%)، أما مضاد Trimethoprim – sulfamethoxazole فبلغت نسبة المقاومة 65.22% .

أظهرت نتائج إختبار حساسية المضادات الحيوية أن 18 (26%) من عزلات *K.pneumoniae* متعددة المقاومة (Multidrug resistance (MDR)، و بينت النتائج أن ست (8.7%) عزلات منها مقاومة لثلاث مجاميع من المضادات الحيوية (Extensive drug resistance (XDR) .

تم تحديد تركيز المثبط الأدنى (MIC) للعزلات قيد الدراسة باستخدام جهاز VITEK2 compact system ، تروحت قيمته (MIC) لمضاد Ampicillin (16 – 32) مايكروغرام/مل أما