جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى / كلية العلوم

الكشف عن إنزيمات NDM-1 في بكتريا *Klebsiella pneumoniae* المقاومة للكاربنيم

رسالة
مقدمة إلى مجلس كلية العلوم - جامعة ديالى
وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من قبل الطالبة
زينه رشيد حميد
بكالوريوس كلية العلوم/ علوم الحياة/ جامعة ديالى
(2015)

إشراف
أ.د. هادي رحمن رشيد الطائي

1440هـ   2019 م

المقدمــة Introduction

يعود جنس *Klebsiella* إلى العائلة المعوية (*Enterobacteriaceae*) التي تمتاز بكونها ذات شكل عصوي – كروي (Coccobacilli)، سالبة لصبغة غرام، مخمرة لسكر اللاكتوز، غير متحركة ، تحتوي على المحفظة و لا هوائية اختيارية (Ryan and Ray, 2014). توجد بكتريا *Klebsiella pneumoniae* بشكل طبيعي في الجهاز الهضمي للإنسان وتستطيع أن تسبب العديد من الإصابات الانتهازية منها الإصابات المكتسبة من المستشفيات Nosocomial infection مثل ذات الرئة، وتسبب أيضا اخماج المجاري البولية، خراج الكبد، الإسهال، عدوى الجروح والعديد من الاخماج الأخرى وعلاج هذا الاخماج يكون معقداً (Chiu *et al*., 2013). تمتلك هذه البكتريا العديد من عوامل الضراوة التي تمكنها من غزو جسم الإنسان وإحداث المرض منها امتلاكها محفظة سميكة من متعدد السكريد، الأهداب، امتلاكها أنظمة نقل الحديد، متعدد السكريد الشحمي وغيرها من العوامل الأخرى مثل إنتاج السموم الداخلية (Aher *et al*., 2012).

استخدمت العديد من المضادات الحيوية لعلاج الإصابات الناتجة عن بكتيريا *K. pneumoniae* منها المضادات التابعة للجيل الثالث والرابع من السيفالوسبورينات مثل Cefepime، Ceftazidime، Cefpirome وغيرها، لكن تزايد مقاومة البكتيريا السالبة لصبغة غرام بشكل عام و *K. pneuminiae* بشكل خاص أدى إلى ضرورة البحث عن بدائل (Hirsch and Tam, 2010) لذا تم اللجوء إلى مضادات الكاربابينيم باعتبارها خياراً علاجياً مهما ضمن مجموعة مضادات البيتالاكتام والتي تشمل العديد من المضادات الحديثة بعضها مكتشف والبعض الآخر قيد الدراسة مثل Ertapenem, ،Imipenem, Meropenem, Biopenem وغيرها إذ تمتاز هذه المضادات بمقاومتها العالية للعديد من الأنزيمات وخاصة إنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف (Extended spectrum β-lactamase) ويرمز لها ESβL (Neuner *et al*., 2011). إن الاستخدام المفرط لهذا المضادات أدى إلى ظهور سلالات بكتيرية مقاومة لها عن طريق العديد من الآليات منها إنتاج إنزيمات Carbapenemases (Pfeifer *et al*., 2010; Rumbo *et al*., 2011)، تقسم إنزيمات الكاربابينيميز إلى ثلاثة أصناف بحسب تصنيف Ambler وهيClass A ومثال عليها أنزيم (KPC)، و Class B ومثال عليها أنزيم (NDM−1) و Class D ومثال عليها أنزيم

(OXA-48) (Cantón *et al*., 2012). تحمل الجينات المشفرة لإنزيمات الكاربابينيم على عناصر جينية متحركة Mobile DNA element (Kumarasamy *et al*., 2010).

إن ظهور المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية من قبل بكتيريا *K. pneumoniae* أدى إلى فشل علاج الكثير من الأمراض التي تسببها هذه البكتيريا، لذا أصبح من المهم البحث عن بدائل للقضاء على هذه البكتيريا (Maurya *et al*., 2012; Yu *et al*., 2011). استخدمت بعض المواد ذات الأحجام النانوية وتطورت صناعتها إذ بذلت جهود كبيرة لتطوير هذه المواد التي تمتلك تأثيرا كبيرا على مكونات الخلية البكتيرية (Maurya *et al*., 2012)، إذ أثبتت الدراسات فاعلية هذه المواد ضد البكتيريا (Roy *et al*., 2010)، ومن هذه المواد النانوية هي اوكسيد الزنك و اوكسيد التيتانيوم وغيرها من المواد النانوية مثل النحاس والكوبلت والسليكون التي تمتلك فاعلية مؤثرة ضد الأحياء المجهرية (Thomas *et al*., 2014).

الأهداف

لأهمية بكتيريا *Klebsiella pneumoniae* جاءت هذه الدراسة تهدف الى الكشف المظهري والجيني عن أنزيم NDM-1 في عزلاتها المقاومة لمضادات للكاربابينيم وقد اتبعت الخطوات الآتية:

1- عزل بكتيريا *K. pneumoniae* وتشخيصها من عينات سريرية مختلفة.
2- الكشف عن مقاومة العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية ومنها مضادات الكاربينيم.
3- الكشف المظهري والجيني عن إنزيمات البيتالاكتميز المعدنية نوع NDM-1 بين العزلات ذات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية.
4- استعمال الجسيمات النانوية للسيطرة على هذه العزلات المهمة من الناحية السريرية.
5- تحديد تسلسل القواعد النتروجينية لجين bla_{NDM-1} و جين 16-23S rRNA للعزلات قيد الدراسة.

الخلاصة

تضمنت الدراسة جمع 250 عينة سريرية من مرضى يعانون من اخماج مختلفة، توزعت ما بين 165عينة إدرار، و37 عينة قشع، و29 عينة من مسحات الحروق و19عينة من مسحات الجروح ومن خلال نتائج التشخيص البكتريولوجي والاختبارات الكيموحيوية، فضلا عن استخدام جهاز VITEK2. أظهرت النتائج إن 85 عزلة تعود لبكتريا *Klebsiella* spp. تضمنت 78 عزلة تعود للنوع *Klebsiella pneumoniae*، و5 عزلات تعود للنوع *Klebsiella oxytoca* وعزلتين تعود للنوع *Klebsiella planticola*، شخصت 14 عزلة وبنسبة 17,9% من بكتيريا *K. pneumoniae* المقاومة لمضادات Carbapenem، أيضا بوساطة تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR) للكشف عن جين 16–23S rRNA، إذ أظهرت النتائج امتلاك 14عزلة لهذا الجين وبنسبة 100%.

اختبرت حساسية عزلات بكتيريا *K. pneumoniae* اتجاه 12 مضاداً حيوياً، فكانت النسب المئوية لمقاومة المضادات الحيوية: Ceftazidime 100%، Ceftriaxone 61%، 82.65% Cefoxitin، Imipenem 14.1%، Gentamicin 41.02%، Doripenem 17.9% Meropenem 17.9%، Tobramycin 39.74%، Ciprofloxacin 21.79%%، Tetracycline 55.12%، Pipracillin 98.71% و Tigecyclin39.74%.

تم الكشف عن قابلية عزلات بكتيريا *K. pneumoniae* قيد الدراسة على إنتاج إنزيمات الكاربابينميز بأستعمال طريقتين للتوصيف المظهري لإنزيمات الكاربابينميز.

الطريقة الأولى وهي طريقة دمج المضاد الحيوي مع EDTA Disk Combine EDTA: Test (CEDT) أشارت النتائج إلى إن 9 عزلات وبنسبة 64.28% أعطت نتيجة موجبة للفحص وكانت العزلات المنتجة لهذه الإنزيمات تحمل مقاومة بنسبة كبيرة للمضادات الحيوية مثل (Ceftazidime، Pipracillin، Amikacin، Ceftriaxone، Ticarcillin، Imipenemو Meropenem)، في حين أعطت 5 عزلات وبنسبة 35.71% نتيجة سالبة للفحص.

الطريقة الثانية هي فحص هودج المحور Modified Hodge Test (MHT) : إذ بلغ عدد العزلات المنتجة لانزيمات الكاربابينميز حسب هذا الفحص 10 عزلات وبنسبة 71.42%، بينما أعطت 4 عزلات وبنسبه 28.57% نتيجة سالبة للفحص.

تم تحديد التركيز المثبط الأدنى Minimum Inhibition Concentration (MIC) للعزلات قيد الدراسة باستخدام جهاز VITEK 2. تراوحت قيم MIC لمضادات Amikacin و

Minocyclineبين(2−64) مايكروغرام/مل. أما مضادات Gentamycin، Ciprofloxacin فكانت القيم (1−16) مايكروغرام/مل (0.25−4) مايكروغرام/مل على التوالي. في حين تراوحت قيم MIC للمضادين Imipenem و Meropenem بين (8-16) مايكروغرام/مل. و Tazobactam Piperacillin و Piperacillin كانت لهما قيمة MIC متساوية 128مايكروغرام/مل، أما المضادانTicarcillin وTicarcillin/Clavulanic acid كانت قيمه MIC لهما 128 مايكروغرام/مل ، و المضاد Tobramycin كانت قيم MIC له (1- 16) مايكروغرام/مل، وأخيرا أظهرت العزلات قيد الدراسة مقاومة عالية للمضاد Trimethoprim/Sulfamethoxazole إذ تراوحت قيم التراكيز المثبطة الدنيا بين (20 -320) مايكروغرام/مل

استخدمت تقنية (PCR) للكشف عن امتلاك العزلات قيد الدراسة لعدد من الجينات التي تشفر إلى إنتاج أنزيمات Carbapenemases إذ استخدمت بادئات لاستهداف جينات bla_{NDM-1}، bla_{OXA-48} و bla_{KPC-2}. أظهرت النتائج امتلاك 13عزلة لجين bla_{NDM-1}، و9 عزلات لجين bla_{OXA-48} في حين أعطت العزلات جميعاً نتيجة سالبة لجين bla_{KPC-2}.

أجري تتابع القواعد النتروجينية لنواتج تفاعل PCR لعينتين بعد إرسال 20 مايكروليتر من ناتج التفاعل مع البادئ الخاص بجين 16-23S rRNA وجين bla_{NDM-1}.

تم تشييد شجرة وراثية مستفيضة لنواتج التضخيم للقطعة bla_{NDM-1} (للموقع الوراثي للهزلتين 113و174) باستخدام برنامج NCBI-Blast Tn.

درس التأثير التثبيطي لمادتي ثنائي اوكسيد التيتانيوم Tio_2 و اوكسيد الزنك Zno ذات الأحجام النانوية الصغيرة تجاه نمو البكتيريا وقدرتها على إنتاج أنزيمات البيتالاكتميز المعدنية لتسع عزلات ذات مقاومة عالية تجاه مضادات Carbapenem. بينت النتائج أن التركيز المثبط الأدنى لمادة اوكسيد الزنك Zno ذات الحجم 50 نانوميتر تراوحت بين (1300−162.5) مايكروغرام/مل في حين تراوحت قيمة MIC لمادة ثنائي اوكسيد التيتانيوم Tio_2 ذات الحجم 25 نانوميتر بين 650−2600 مايكروغرام/ مل. أما نتائج تأثير الجسيمات النانوية لمادتي اوكسيد الزنك وثنائي اوكسيد التيتانيوم على إنتاج إنزيمات البيتالاكتميز المعدنية فكانت متساوية للمادتين إذ فقدت5 عزلات من أصل9 قدرتها على إنتاج إنزيمات البيتالاكتميز المعدنية وبنسبة 55.55%.