جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

كلية التربية للعلوم الصرفة

دراسة بكتريولوجية لبعض الاجناس البكتيرية السالبة لصبغة غرام المقاومة لمضادات البيتالاكتام والمعزولة من اخماج المجاري البولية في محافظة ديالى.

رسالة مقدمة الى

كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة – الأحياء المجهرية

من قبل

محمد خضير عباس النعيمي

بكالوريوس علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة ديالى 2010– 2011

بإشراف

أ.د. عباس عبود فرحان الدليمي

1435هـ 2014م

المقدمة

1. المقدمــة Introduction

تُعدُّ اخماج المجاري البولية من المشاكل التي تأتي بالمرتبة الثانية بعد أمراض الجهاز التنفسي، فهي تحظى باهتمام الباحثين ، والعاملين في المجال الطبي، وتكمن خطورتها في زيادة معدل الوفيات من خلال ما تُحدثه من أضرار كبيرة في الكلية مسببة العجز الكلوي . لذا فقد ازدادت الدراسات المتعلقة بالعوامل المسببة لهذه الالتهابات، ولا سيما الجرثومية منها (Foxman *etal.*, 2000) .

تعد البكتيريا السالبة لصبغة كرام من أفراد العائلة المعوية المسبب الرئيس لهذا النوع من الالتهابات ، فهي تشكل ما مقداره (40 – 80 %) من مجموع مسببات التهابات الكلية ، وقد أشارت الدراسات إلى أن بكتيريا *Escherichia coli* واحدة من الأنواع البكتيرية المهمة الأكثر تسبباً في حدوث اخماج المجاري البولية سواء كان في ضمن أفراد المجتمع أو المرضى الراقدين في المستشفيات (Todar, 2002) .

إزداد الإهتمام بدراسة عوامل الضراوة لهذه البكتريا ذات العلاقة المباشرة أوغير المباشرة بالإمراضية ، ومن أهمها الهيمولايسين واليورييز لكونها عامل ضراوة تمتلكه العديد من أنواع البكتريا وينتج من قبل العديد من الاجناس البكتيرية المسببة لخمج المجاري البولية مثل *Proteus , klebsiella , Pseudomonas* (Ahmed *et al.*,2003) .

تمتلك البكتريا السالبة لصبغة كرام القدرة على تكوين الأغشية الحيوية، هو تجمع لأحياء مجهرية مع إفرازاتها الخارج خلوية ويكون هذا التجمع بأشكال عدة، إما بعضها مع بعض بهيأة تجمعات(Aggregates)، أو إنها تلتصق على سطح ما مثل التصاقها على سطح صخرة أو على سطح الأسنان أو على سطح بركة في فراغات دقيقة تسمى الأسطح البينية (Interfaces) (Hassan *etal.*, 2011).

يؤدي الحديد دور المفتاح بوصفه عاملاً مساعداً في سلسلة نقل الإلكترون لمختلف الأنزيمات كما يعد الحديد عنصراً مهماً لنمو البكتريا وإحداث الامراضية (Lawlor *et al.*, 2007)

ولكي تنمو البكتريا بنجاح في أنسجة المضيف يجب أن تأخذ الحديد من البروتينات الناقلة في المضيف(host transport protein) (Bach *etal.*, 2000)،والسايدروفورات Sidrophoresهي مركبات كلابية Iron chelators ذات أوزان جزيئة واطئة لها القدرة على سحب الحديد من بروتينيات المضيف المرتبطة بها (خلف وجرجيس ،2011).

أدى الاستخدام العشوائي للمضادات الحيوية إلى ظهور ممرضات بكتيرية انتهازية مقاومة لهذه المضادات الحيوية، و من التقنيات التي تبديها البكتيريا لمقاومة مضادات β-lactam هو إنتاجها لأنزيمات β-lactamase التي تحلل حلقة β-lactam (Sobia *etal*, 2011).

استخدمت طرائق مظهرية عدة لتشخيص إنزيمات ESβLs و MβLs وان الدراسات الحديثة تعتمد على استخدام تقنية التفاعل التسلسلي للبوليميريز (Polymerase Chain Reaction (PCR للتحري عن الجينات التي تشفر إنزيمات β-lactamase (Pitout and Laupland, 2008).

نظرا لاهمية الدراسات الخاصة بتحديد نوعية الاجناس البكتيرية السالبة المقاومة لمضادات البيتالاكتام والمسببة لاخماج المجاري البولية بين الراقدين وغير الراقدين في المستشفيات العراقية جاءت هذه الدراسة لتسلط الضوء على مايلي:

1. تحديد الأجناس البكتيرية الأكثر شيوعا المسببة لاخماج المجاري البولية ومعرفة مقاومتها لمضادات البيتالاكتام و دراسة حساسية العزلات لمضادات البيتالاكتام وتحديد التركيز المثبط الادنى (MIC) لبعض هذه المضادات.
2. إجراء دراسة مقارنة بين عوامل الضراوة للأجناس المختلفة .
3. الكشف عن جينات bla_{Tem}, bla_{shv} المشفرة لانزيمات البيتالاكتاميز المحطمة لمضادات البيتالاكتام.

SUMMARY

Three hundred urine from patients suffering from urinary tract infection from Baaquba Teaching Hospital and Al –Batool Hospital in Baaquba city for the period from 1/09/2013 to 1/01/2014.

The results reved that 66 isolates are belonging to bacteria of Gram negative (57.4%), 25 (37.78 %) *Escherichia coli* , 22(33.33%) *Proteus mirabilis* , 9(6.06%)*Klebsiella pneumonia* ,5(7.57%) *Enterobacter* spp for 4 (25%) *Enterobacter cloacae* and 1(5.51%) *Enterobacter aerogenes* and5(7.57%) *Pseudomonas aeruginosa* by using diagnostic phenotypic ,biochemical tests and confirm the diagnosis using regular aPI20E.

Investigation of some virulence factors showed that both *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* produced haemolysin 52% and 90.9% respectively.

The production of biofilm by local isolates was detected in Congo–red way, Isolates of *Escherichia coli and Proteus mirabilis* had been shown the ability to produce biofilm 92% and 90.9% respectively.

The results showed that all isolates of *Proteus mirabilis* produced urease by 100% ,while the results detect that the isolates of *Escherichia coli* not able to produce this enzyme.
Proteus mirabilis showed ability to produce swarming with 100% .

Siderophore production by *Escherichia coli and Proteus mirabilis* was 48% , 9% respectively.

Eschrichia coli, and Proteus mirabilis produced bacteriocin with percentag of 32% and 50% respectively.

The production of β-lactamase by *Eschrichia coli and Proteus mirabilis* was 60% , 40.9% respectively, also the isolated had the ability to produce the Extendended spectrum β-Lactamase enzyme by using disc Approximation ,The production from each of*Eschrichia coli* and *Proteus mirabilis* 12% , 31.8 % respectively.

Results of Metalloβ-Lactamase by using the Imp-EDTA combination indicated that *E.coli* and *P.mirabilis* were 12% and 13.6% respectively.

Isolates of *E.coli* showed highest resistance rate 92% for Augmentin while isolates of *P.mirabilis* showe higher resistant to cefotaxime 81.8%.

SUMMARY

The results showed that multiple resistance pattern for antibiotic 43 (91.5%) resistant to (2-5) antibiotics, Isolates of *E.coli* showed highest multiple resistance rate 92% while isolates of *P.mirabilis* rate 90.9% .

The Minimal inhibitory concentration (MIC) for namely two antibiotics Cefotaxime , Ceftazidime were determined.MIC values of these antibiotics ranged between (2-<1024), (4-<1024) µg\ml *E.coli* and (2-<1024),(8-<1024) µg\ml *P.mirabilis* respectively.

The results of molecular detection of ESBL genes *(bla* $_{TEM}$ and *bla* $_{SHV}$) by using PCR technique ,(9) samples from (10) total , divided into 3(100%) *E.coli* and 6(85.7%) *P.mirabilis* were harboring *bla* $_{TEM}$ gene based on the presence of 950 bp bands in 1% agarose gel. while results detect that the isolates of *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* not harboring *bla* $_{SHV}$ gene.