جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى
كلية التربية للعلوم الصرفة
قسم علوم الحياة

# دراسة بكتريولوجية ووراثية لبكتريا *Klebsiella* spp المعزولة من إصابات مرضية مختلفة

رسالة مقدمة الى
كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى
وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة – الأحياء المجهرية
من قبل

**إيمان عباس علي نور الله الزنكنه**

بإشراف

أ.د. عباس عبود فرحان الدليمي  أ.م.د. هادي رحمن رشيد الطائي

صفر 1434هـ  كانون اول /2012 م

# الفصل الأول/المقدمـــــة

## 1. المقدمــة Introduction:

يعود جنس الكليبسيلا الى العائلة المعوية (*Enterobacteriaceae*) الذي يتميز بأنه سالب لصبغة كرام، يتراوح عرضها بين ( 0.3 – 1) مايكروميتر، أما طولها فيتراوح بين (– 6 0.6) مايكروميتر، وتمتاز هذه البكتريا بأنها غير محللة للدم ولاتنتج غاز H2S وأكثر أنواعها لها القدرة على أستهلاك اليوريا، وتكون مستعمراتها وردية اللون، ومخاطية، وملساء على وسط الماكونكي الصلب، وتحتوي على المحفظة ومخمرة لسكريات اللاكتوز، والكلوكوز، والسكروز، غير متحركة، ولاهوائية أختيارية، وقضيبية الشكل، ومنتجة للحامض في الكلوكوز (Sharmeen et al.,2012) و (Todar,2007)، (Talaro, 2002).

تعد بكتريا الـ *Klebsiella* من الممرضات الأنتهازية opportunistic pathogens، ومقاومة لعملية البلعمة لأحتوائها على المحفظة (Umhe et al.,2006).

تسبب هذه البكتريا العديد من الأمراض لا سيما الأمراض المكتسبة في المستشفيات ومنها إلتهاب القناة البولية والقناة التنفسية وجروح العمليات والسحايا، وإصابات الأذن الوسطى وإصابات الأغشية المخاطية الطرية وتنخر الأنف وإصابات الرئتين ( Kumar and Talwar,2010) و(Douglas,2008) .

تمتلك بكتريا الـ *Klebsiella* عدداً من عوامل الضراوة التي تشترك بامراضيتها من ضمنها مستضدات المحفظة وعوامل الالتصاق المتمثلة بالخمل وانتاج الذيفانات الداخلية مثل متعدد السكريد الشحمي تمتاز هذه البكتريا بمقاومتها للمضادات الحيوية واسعة الطيف، إذ تستطيع مقاومة مضادات البيتا لاكتام عن طريق إنتاجها لأنزيمات البيتا لاكتاميز التي تعمل على تحطيم حلقة البيتا لاكتام وجعلها جزيئات غير فعالة حيوياً ومما يزيد في خطورة هذه الانزيمات حصول الطفرات في الجينات المسؤولة عن تشفيرها لتحولها الى انزيمات واسعة الطيف مقاومة لمضادات البيتالاكتام الحديثة ومنها الاجيال المتطورة للسيفالوسبورينات ( Nass *et al* ., 2003) (Keynamy and Rubinstlen,2007) .

تم حديثاً الإعلان عالمياً عن مرض يسمى السوبر بكتريا تسببه بكتريا *Klebsiella Pneumonia*، ثم تلا ذلك اكتشاف أصابات في الهند والباكستان والمملكة المتحدة والولايات المتحدة الأمريكية، وكندا واليابان، وهي آخذة بالانتشار بين المصدر في الهند والدول الأخرى نتيجة النقل والسفر والأصابة بهذا المرض تؤدي الى ظهور مقاومة عديدة للمضادات الحيوية ولاسيما مضادات البيتا لاكتام(pillai *et al.*,2011).

من جانب اخر ونتيجة للتطور الصناعي الهائل وتلوث البيئة بمختلف المعادن الثقيلة الذي رافقه ظهور سلالات مطفرة حاملة لصفة المقاومة للمعادن الثقيلة فقد عزلت من هذه السلالات بلازميدات اقترانية مشفرة لمقاومة المضادات المتعددة والمعادن الثقيلة معاً ( Sliver and Misra,1984).

يُشفر لمقاومة المضادات الحيوية عناصر وراثية خارج كروموسومية Extracromosomal genetic elements تمتاز بكونها دائرية إذ تحتوي على معلومات وراثية تنتقل من خلية بكتيرية الى أخرى عن طرق الأقتران تُدعى البلازميدات وهي تحمل جينات تُشفر لمقاومة المضادات الحيوية، إنتاج البكتريوسين، المقاومة للأيونات المعدنية السامة، إنتاج السموم وعوامل ضراوة أخرى (Greenwood et al.,2007) .

يعد الأقتران البكتيري من أكثر الطرائق شيوعاً لأنتقال بلازميدات المقاومة وعوامل الضراوة، وبصورة سريعة في المجاميع البكتيرية، وليس بالضرورة أن يحدث الأقتران في السلالات أو الأنواع القريبة فهو يحصل بين الخلايا المانحة والمستلمة من مختلف العوائل (Dionisio et al.,2002 ) و( Ochman et al.,2000 ).

ولقلة الدراسات المتعلقة بهذه البكتريا جاءت هذه الدراسة لتهدف الى ما يلي:

1- عزل وتشخيص *Klebsiella* spp من مرضى مصابين بأخماج سريرية مختلفة والتعرف على وبائية هذه البكتريا المعزولة من المرضى في مدينة بعقوبة .

2 - التحري عن عوامل الضراوة المختلفة لبكتريا *Klebsiella* spp .

3- دراسة نمط المقاومة للمضادات الحيوية وتحديد نسق المقاومة السائد بين العزلات .

4 – إيجاد العلاقة بين مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية وتحملها المعادن الثقيلة .

5– دراسة النسق البلازميدي لبكتريا *Klebsiella* spp .

6– دراسة أمكانية أنتقال صفة المقاومة للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة بأجراء عملية الأقتران الوراثي .

## SUMMARY

This study included collection of 206 clinical sample, are as follows, 70 sample injuries , 56 sample burns , 57 sample sputum and 23 sample urine , from patients suffering various infections in hospitals of Baquba City for the period from 15/9/2011 to 12/1/2012.

The results of bacterial culture on media of MacConkey Agar , blood Agar, media of Eosin methylene blue, diagnostic phenotypic , biochemical tests and confirm the diagnosis using regular API20E, VITEKA2 that 22 isolates are belonging to bacteria of *Klebsiella pneumonia*

The results of the investigation of some virulence factors of Klebsiella pneumonia, that all isolates are surrounded by capsule , and uncapable of producing the hemolysine enzyme , while showed all isolates the ability to produce the urease enzyme, and production of Biofilm, while productivity isolates of Bacteriocin has amounted to 40.9%.

19 isolates (86.4%) showed ability to produce β-Lactamase enzyme , also have the ability to produce the Extendended spectrum β-Lactamase enzyme by using Disc Approximation , where was 9 isolates (40.9%), testing has been its ability to produce enzymes Metalloβ-Lactamase and using the Imp-EDTA combination disc as managed 12 isolates (54.5%) production of the enzyme.

All isolates showed pattern of multiple drug resistance towards 16 anti biotics , as were all isolates (100%) were resistance to antibiotics Ampicillin , Carbencillin , and Pipracillin, while most of the isolates were sensitive to Imipenem and chloramphenicol, and varied resistance ratio for the rest of antibiotics.

The results showed that there is a clear difference in MIC values and most isolates were able to resist high concentrations for Ampicillin and Carbancillin in concentrations (512 - 1024) µg / ml, while isolates were sensitive to Imipenem in concentrations (4 - 32) µg / ml.

Detection tolerate of bacteria to different concentrations of heavy metals and that their growing them on media containing different concentrations (3, 1.5, 0.03, 0.03 and 1.5) mmol. of metals (copper, cobalt, mercury, silver, and zinc) respectively where the highest concentration tolerance the bacteria to copper(3) mmol. , and the lowest concentration tolerance to metallic mercury and silver (0.01)

The results show that plasmid profile of the most isolates under study contain two plasmid band in different size, while some isolates were plasmidless .

In the current study was conducted the bacterial conjugation for a group of bacterial isolates that have shown high resistance to antibiotics and heavy metals as well as the production of enzymes β-Lactamase with the standard strain *E.coli*MM294, and the Isolates were unable to achieve the conjugation in the liquid media or solid agar by Seldeen method, while 18 isolates which contain plasmids were able to achieve conjugation (100%) on solid agar by Miller method where depended on heavy growth and direct contact between the donor and recipient strains .

The current study found by investigation the plasmid profile for conjugated cells that the most of the plasmids had transferred from donor strain which represent by the isolates under study to standard strain , where 15 trans conjugated isolates (83.3%) from 18 isolate can produce β-Lactamase enzyme , while 9 trans conjugated isolate (50%) can produce extended spectrum β-Lactamase enzyme , and 10 trans conjugated isolate 55.6)%) can produce Metallo β-Lactamase enzyme , in addition to the multi drug resistance and the heavy metal tolerance were transferred to the trans conjugated cells , a condition implying that they are plasmid mediated.