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

التحري الجزيئي عن نظام السم – مضاد السم النوع الثاني وبعض عوامل الضراوة المرتبطة بالسطح في بكتريا *Klebsiella pneumoniae*

رسالة مقدَّمة

إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من قبل الطالبة

سحر حسين رشيد القيسي

بكالوريوس علوم حياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة بغداد 1993
دبلوم عالي / كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة ديالى **(2020–2021)**

بإشراف

أ.د. علي جعفر سليم

1447هـ **2025م**

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة لتحديد بعض جينات الضراوة في بكتيريا *Klebsiella pneumoniae* المعزولة سريريًا في بعقوبة جُمعت 570 عينة سريرية من مرضى مستشفيي بعقوبة والبتول التعليميين ومختبرات خارجية في محافظة ديالى في خلال المدة من 12 أيلول 2023 إلى 20 كانون الثاني 2024، اذ عُزلت 50 عزلة من بكتيربا *K . pneumoniae* من مصادر شلمت (الجروح، الأدرار، القشع ،مسحات من المهبل ، الحروق ، الدم) وبنسبة (8.7 %) وبعد زرع العينات باستخدام أوساط أكار الماكونكي وأكار الدم ووسط أيوسين أزرق المثيل Eosin Methylene Blue Agar (EMB) تم تأكيد التشخيص بالطرق المظهرية والمجهرية والكيموحيوية .

أجريت اختبارات الحساسية للمضادات الحيوية على جميع عزلات لبكتريا *K.pneumoniae* والبالغ عددها (50) اتجاه (12) مضاداً حيوياً باستخدام طريقة الأقراص (Kirby-Bauer)،اذ أظهرت العزلات البكتيرية قيد الدراسة مقاومة متفاوتة للمضادات التي تم اختيارها كما يلي : AM و CTX وFEP 50 (100%) ، AK 47 AMC(94%) ، 44(88%)، CIP وATM 37(74%)، TE 35(70%)، LEV 28(56%)، CN وSTX 17(34%) ، IMI 14(28%).

أظهرت الدراسة الحالية أن جميع العزلات *K. pneumoniae* الخمسين وبنسبة (100%) ; أبدت مقاومة متعددة للمضادات الحيوية (MDR) . بالأضافة الى ذلك قاومت 15 عزلة (11-12) مضادًا حيويًا، مما يشير إلى مقاومة واسعة النطاق (XDR) ، كشف التحليل التجميعي لنتائج الفحص المظهري لحساسية المضادات الحيوية عن تنوع كبير في مقاومة عزلات K. *pneumoniae* المختلفة مما يدل على انتشار سلالات مرضية متعددة .

الدراسة الحالية كشفت عن بعض عوامل الضراوة في بكتيريا *K. pneumoniae* شملت المحفظة الهيمولاسين، وإنزيمات البيتا لاكتاميز المعدنية(MBL) ، وإنزيمات البيتا لاكتاميز واسعة الطيف

(ESBL)، وإنزيم AmpC ، وتكوين الغشاء الحيوي، أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن جميع العزلات لبكتيريا *K. pneumoniae* والبالغ عددها 50 عزلة كانت ذات محفظة وبنسبة وصلت (100%)، بينما لم تُنتج أي منها إنزيم الهيمولاسين وبنسبة 0% ، وأظهرت الدراسة أن 50% من العزلات (50/25) أنتجت إنزيماتMBL ، و 52% (50/26) إنزيماتESBL ، و 22% (50/11) إنزيمAmpC و جميع عزلات (50/50)أنتجت غشاءً حيويًا، بتقييمها بطريقة صفيحة المعايرة الدقيقة عند 630 نانومتر، وكان إنتاجه قويًا في (26) عزلة وبنسبة 52% من العزلات، ومتوسطًا في(22) وبنسبة 44 %، وضعيفًا في (2) ونسبة 4%.

وكشفت الدراسة الحالية عن خمسة من جينات ضراوة تضمنت (*wcaA* , *wabG* , *fimH* , *mrkD magA*) في 24 عزلة من بكتريا *K . pneumoniae* من مصادر سريرية مختلفة حيث كان تردد هذه الجينات بين العزلات قيد الدراسة (3 .58 %، 8.3% ، 37.5%، 4.1% ، و 0%) على التوالي ، إذ تساهم هذه الجينات في تكوين الأغشية الحيوية والأصابة من خلال تسهيل الألتصاق السطحي وتشكيل المستعمرات الدقيقة والانتشار.وأظهرت نتائج الكشف عن جينات النظام الثاني للسم –مضاد السم في بكتريا *K . pneumoniae* عن وجود مورثات هذا النظام *mqsA* و *mqsR* وبنسب بلغت 62.5% و41.6 % على التوالي ،

أظهر مخطط التحليل التجميعي للعلاقات الوراثية بين العزلات *K . pneumonia* المحلية ، تنوعا وراثيا كبيرا بين العزلات قيد الدراسة وقد يعود ذلك لتنوع مصادر عزل البكتريا وقدرتها على التسبب بالعدوى المتنوعة ، و كشف التنميط الجزيئي لـ 24 عزلة من *K. pneumoniae* باستخدام-ERIC PCR عن 11 نمطًا وراثيًا مختلفًا، تشمل أربع سلالات وسبع عزلات منفردة. احتوت أكبر سلالة على عشر عزلات مصدرها التهابات المسالك البولية والحروق والدم. بينما توزعت العزلات المنفردة على القشع (3)، والجروح (2)، والدم (1)، والمهبل (1) ، وكشف التحليل الشجري عن تباين في عزلات *K. pneumoniae* الأربعة والعشرين المدروسة ، إذ تراوحت نسبة التشابه بين العزلات المفردة

والنسائل بين 0- 40%، بينما أظهرت عشرون عزلة تشابهاً بنسبة 50- 100%، وأظهرت الدراسة الحالية وجود ارتباط بين شدة تكوين الأغشية الحيوية والأنماط الوراثية لـERIC-PCR ، وبنسب متفاوتة ويُعزى ذلك على الأرجح إلى اختلاف مصادرعزلات *K. pneumoniae* ونسبها المئوية بالإضافة إلى تفاوت قدرتها على إنتاج الغشاء الحيوي .

الفصل الاول

المقدمة

1-المقدمة Introduction

تُعد بكتيريا *Klebsiella pneumoniae* أهم أنواع جنس *Klebsiella*، وتعود الى العائلة المعوية Enterobacteriaceae ، وتعد من أهم أنواع البكتريا السالبة لصبغة كرام التي تسبب اصابات خطيرة في المجتمع اضافة الى معدلات الوفيات العالية اذاكانت مكتسبة عن طريق المستشفى Nosocomal infection (Martin وBachman ، 2018) و تعد بكتيريا *K. pneumoniae* من الممرضات الانتهازية، حيث أنها تكون جزءا من النبت الطبيعي في الامعاء الا أنها تتحول الى مرضية ، حيث تغتنم فرصة ضعف الجسم في بعض الحالات الخاصة أثناء الإصابة مع أمراض أخرى كذلك الحال بالنسبة لحديثي الولادة والأطفال وكبارالسن و الأشخاص ذوي المناعة المنخفضة (Wyres واخرون ، 2020) وتتسبب الكلبسيلا الرئوية بالالتهاب الرئوي، كما أنها قد تسبب عدوى المسالك البولية، أو التهاب السحايا البكتيري، أو التهاب باطن المقلة، وكذلك خراج الكبد القيحي ، وربما تنتشر في الدم مسببة تجرثم الدم وكذلك تسبب التهابات الحروق والجروح (Kirsten، 2022) و تعد أيضاً من أسباب عدوى المسالك البولية عند الحوامل مما يسبب الولادة المبكرة، والإنتان الوليدي، وإذا لم تعالج البكتيريا فقد تسبب تأخر نمو الجنين داخل الرحم، ونقص وزن الرضيع عند الولادة (Christine ، 2022) ، وفي دراسة حديثة أكدت أن *K.pneumoniae* ; تستعمر البلعوم الأنفي والجهاز الهضمي بطريقة غير مصحوبة بأعراض من دون انتشارها إلى أنسجة أخرى، وأن استعمار الجهاز الهضمي شرط أساسي للإصابة (Gonzalez وآخرون، 2023).

يعتبر ظهور عزلات *K. pneomonniae* المقاومة للمضادات الحيوية مشكلة عالمية مهمة في الطب البشري ، لأنها تعزز الاحتمالية أن المضادات الحيوية قد تفشل في علاج المرضى عند الاصابة المكتسبة من المجتمع والمستشفيات ، وذلك لصعوبة علاج الالتهابات الناجمة عن البكتيريا المقاومة للأدوية المتعددة (Kalelkar وآخرون2022) ، أصبحت هذه البكتريا تمتلك مقاومة عالية للمضادات الحيوية المستخدمة في العلاج نتيجة اكتسابها لبلازميدات المقاومة ، إذ وجد أن هذه البكتريا تنتج أنزيمات مختلفة بحسب البيئة المحيطة ونوع المضاد الحيوية المستخدم (Khalifa وآخرون، 2021).

وتمتلك بكتريا*K.pneumoniae* العديد من عوامل الضراوة (virulence factors) التي تجعلها قادرة غزو الجسم ومن ثم إحداث الإصابة، وتعد المحفظة(Capsule) أحد عوامل الضراوة المهمة بالأضافة الى الهيمولاسين وأنزيمات اليتا لاكتام واسعة الطيف Extended-spectrumbeta-lactamase (ESBL)، وانزيمات البتالاكتام المعدنية Metallo-β-lactamases (MBL)

وأنزيمات Ampicillinase Class C Beta Lactamas (Amp C) بالاضافة الى الغشاء الحيوي Biofilm الذي يعد من عوامل الضراوة المهمة ، حيث يساعد البكتريا على الألتصاق والاستعمار وغزو الجسم بمساعدة نظام التنبيه والاستجابة، والذي يسمى أستشعار النصاب(Quorum sensing) (Al-Timimi ، 2021).

يتم التعبير عن عوامل الضراوة من خلال جينات متخصصة تسمى جينات الضراوة virulence genes)) ، ومنها (*fim H ، mrk D ، wabG، wcaA، magA ، mqsA ، mqsR)* ولكل واحد منها دوره في أظهار الصفات التي تجعل البكتريا ذات مستوى عالي من الأمراضية وأحدث الاصابة قي المجتمع أو في المستشفى بالاضافة الى دورها الكبير في مقاومة المضادات الحيوية مثل الجينات التي تشفرالى المحفظة في *K.pneumoniae* بالاضافة الى جينات الخمل و الغشاء الحيوي (Hosseini وآخرون، 2023)، و يمكن الاعتماد في دراسة جينات الضراوة على تفاعل البوليميراز المتسلسل PCR بشكل كبيرحيث تعتمد هذه الطريقة على جودة وكمية الحامض النووي المستخدم في تشخيص جينات الضراوة المشفرة بالكروموسومات والبلازميد الكبيرة في وقت واحد في عدد محدود من الخلايا المستهدفة ، أذ تمتاز هذه التقنية بالدقة والسرعة (Heller وآخرون 2020) .

يعد تحديد نوع البكتيريا الممرضة على مستوى السلالة أمرا مهم للتشخيص والعلاج المناسب والمراقبة الوبائية للعدوى البكتيرية ، لاسيما بالنسبة للبكتيريا التي تظهرمستويات عالية من مقاومة المضادات الحيوية أو مستوى عالي من الضراوة للحد من تفشي الأمراض أو الملوثات للأغذية ومياه الشرب ،ويقصد بالتنميط Typing هو عملية تمييز أنماط عزلات بكتيرية مختلفة ترجع لنفس النوع (Agarwal و Gupta،2021)، وهناك عدة طرق للتنميط الجيني ومنها Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC-PCR) تستخدم للتنميط الجيني للبكتيريا، حيث تعتمد على تحليل تسلسل الجينات المتكررة والعشوائية بين الجينات، مما يسمح بتحديد التنوع البيولوجي وتحديد العلاقات بين العزلات المختلفة (Taha وآخرون 2023) .

بكتريا *K. pneumoniae* في محافظة ديالى في مدينة بعقوبة تسبب مشاكل صحية خطيرة وهي مركز المحافظة نلاحظ وجودها مرتبط في حالات العدوى الشديدة في المستشفيات والمكتسبة من المجتمع ما انتجت بكتريا متعددة المقاومة للادوية Multi drug resistant (MDR) والمقاومة للأدوية على نطاق واسع Extensively drug- resistant (XDR) ما قد يسبب مشاكل صحية كبيرة للمجتمع في حالة انتشار السلالات الجديدة المقاومة ونظرا" لظهورسلالات ، ولأهمية *K.*

pneumoniae في إحداث الكثير من الامراض و زيادة مقاومتها للمضادات الحيوية وامتلاكها العديد من عوامل الضراوة والبلازميدات التي تساعدها على الانتشار والتكييف مع الظروف البيئية الجديدة لذا جاءت هذه الدراسة لتهدف الى :

التحري عن انتشار بعض جينات الضراوة في بكتريا *K. pneumoniae* بين العزلات المحلية السريرية في مدينة بعقوبة ودراسة مقاومتها لبعض المضادات الحيوية المستخدمة من خلال الخطوات الاتية :

1- الكشف عن بكتريا *K. pneumoniae* وعزلها من عينات سريرية مختلفة (الأدرار، والقشع ، والحروق ، والجروح ، والمهبل ، و الدم) وتشخيصها مظهريا .

2- إجراء اختبار الحساسية لمجاميع المضادات الحيوية الشائعة الإستخدام وتحديد البكتريا المقاومة للأدوية المتعددة (MDR).

3- الكشف المظهري عن بعض عوامل الضراوة (المحفظة ، و الهيمولاسين ، وانزيم (MBL) ، وأنزيمات البيتا لاكتام واسعة الطيف (ESBL) ،وأنزيم (Amp C) ،و تكوين الغشاء الحيوي).

4- الكشف عن بعض جينات الضراوة (*fim H* ، *mrk D*، *wabG*، *wcaA*، *magA*).

5- الكشف عن جينات نظام السم _ مضاد السم النوع الثاني (*mqsA* و *mqsR*) .

6- التنميط الجزيئي باستخدام تقنية ERIC- PCR gene للسلالات البكتريا قيد للدراسة الحالية .