دراسة مقارنة لعوامل الضراوة الخاصة ببكتيريا الكليبسيلا .Klebsiella spp المعزولة من بيئات مختلفة

1. أ.م.د. ليث مصلح نجيب
2. نغم معد حمدي
[1] كلية العلوم – جامعة الأنبار– العراق
[2] كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة الأنبار– العراق
البريد الالكتروني: **nugha_m@yahoo.com**

الملخص

أجريت الدراسة الحالية للتحري عن عوامل الضراوة Virulence factors المختلفة للعزلات البكتيرية المقاومة للمضادات الحيوية والمعزولة من بيئات مختلفة . حيث تم تجميع 247 عينة سريرية وبيئية من مصادر مختلفة معزولة على وسط الأجار المغذي ، وقد بينت نتائج الزرع البكتيري أن 46 عزلة تعود إلى بكتيريا *Klebsiella* ، كما أبدت العزلات نتائج متباينة تجاة المضادات الحيوية ومن نتائج المقاومة والحساسية للمضادات الحيوية تم أختيار 18 عزلة بكتيرية مقاومة للمضادات الحيوية لدراسة بعض عوامل الضراوة وللتحري عن الجينات المسؤولة عن صلة القرابة مابين العزلات بأستخدام (PCR) وبينة النتائج أن معدل التشابه الوراثي الكلي للعزلات البيئية والمرضية 64 % ، مما يدل على أن مصدر الاخماج البكتيرية قد تكون من ملامسة التربة أو الماء.

الكلمات المفتاحية : *Klebsiella pneumonia* ، المقاومة للمضادات الحيوية ، عوامل ضراوة الكليبسيلا .

Abstract

The Current study conducted to investigate of different virulence factors for bacterial isolates resistant to antibiotics and isolated from different environments. where it was collected 247 clinical and environmental samples from different sources isolated on Nutrient agar media. The results of bacterial culture have shown that 46 isolation dating back to the bacterium *Klebsiella spp* , isolates also showed mixed results towards antibiotics . and antibiotic sensitivity results were selected 18 bacterial isolates resistant to antibiotics to study some of the virulence factors ant to investigate the genes responsible for the kinship between the isolates using (PCR), and the results showed the overall rate of similarity of isolates sick and environmental by 64%, which shows that source of bacterial infections maybe caused by contact with water or soil.

Keywords: *Klebsiella spp.,* Resistance of antibiotics, Virulence factors of *Klebsiella,*

المقدمة

تُعّد بكتيريا الكليبسيلا *Klebsiella spp* من أهم مجاميع الأحياء المجهرية الملوثة للتربة والمياه والتي تؤدي إلى أمراض عديدة سواء للإنسان أو الحيوان أو النبات ، كما تعد من المسببات المرضية للعديد من الإصابات البكتيرية المكتسبة في المستشفيات كإلتهاب القناة البولية (UTI) وإلتهاب الرئة المكتسب Community acquired pneumonia والسحايا وغيرها من الأمراض [1] وقد عرفت بكتيريا الكليبسيلا *Klebsiella sp.* منذ أكثر من مائةٍ وعشرين سنة ماضية حيث أنها تعود الى العائلة المعوية Enterobacteriaceae ، التي تتصف بأنها غير متحركة تميل إلى أن تكون أكثر إستدارة و أكثر سمكاً من الأنواع الأخرى في العائلة المعوية ،وأكثر أنواعها له القدرة على أستهلاك اليوريا [2] . وتعد الكليبسيلا *Klebsiella* من الممرضات الأنتهازية ومن أكثر البكتريا السالبة لصبغة جرام إنتشاراً وشيوعاً حيث يمكن العثور عليها في

كل مكان في الطبيعة ، حيث توجد في الإنسان والحيوان والتربة والمياه وتستعمر الأجهزة الجسمية المختلفة [3]، وشخصها [4] كذلك في الحشرات Insects إذ عزلت من الجراد والنحل والصراصير التي تلعب دوراً مهماً في نقل الإصابة البكتيرية في المستشفيات إذ تعمل كنواقل ميكانيكية للبكتيريا ويعتقد أن هذا يعود إلى وجود أنواع منها تستطيع التكيف . وقد فسر [5] قدرة هذه البكتريا على إحداث الإصابة لأمتلاكها عدداً من عوامل الضراوة Virulence factors التي تلعب دوراً مهماً في تسببها للمرض وتمكنها من الأختزال والتضاعف داخل جسم المضيف من ضمنها المحفظة Capsule التي تكسب البكتريا الصفة المخاطية وعوامل الألتصاق Adhesion التي تمكنها من الألتصاق بسطح الخلية للمضيف وغيرها من العوامل .أصبح معالجة الأمراض الناتجة عن هذه البكتريا في وقتنا الحاضر صعباً ومعقداً ويتطلب تطوير الكثير من المضادات الحيوية وذلك لمقاومة البكتريا لهذه المضادات كمضادات البيتالاكتام ومنها السيفالوسبورينات Cephalosporin's [6] ، كما فسر[7] سبب هذة المقاومة إلى الأستخدام الواسع والمتكرر للمضادات الحيوية وهذه المشكلة تُعّد من أكثر المشاكل الطبية التي تواجه العالم حالياً والتي تؤدي إلى عدم السيطرة على الأمراض. كما أستطاعت البكتريا من تطوير أليات عديدة لمقاومة المضادات الحيوية بالرغم من تطور هذه المضادات بصورة كبيرة كأنتاجها لمضادات البيتالاكتاميز β-Lactamase وغيرها من الأليات الأخرى . ومن الناحية الوراثية فقد أشارت دراسة [8] أن هناك عناصر وراثية تسمى البلازميدات Plasmids والتي تعد ناقل مهم للجينات المسؤولة عن عوامل الضراوة في البكتريا كالغشاء الحيوي وأنتاج الهيمولايسين حيث تعد السبب الرئيس لأحداث الخراريج البكتيرية التي قد تؤدي إلى الوفاة لأمتلاكها فعالية عالية لمقاومة المحاليل المطهرة ، كذلك عن ظهور المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية وأنتقالها من جنس لأخر.

أهداف البحث :

1- عزل وتشخيص بكتيريا *Klebsiella spp* من مواقع بيئية مختلفة (الأنسان ، التربة ، الماء) المقاومة للمضادات الحيوية وأجراء دراسة مقارنة بين عوامل الضراوة الخاصة ببكتريا الكليبسيلا .
2- دراسة صفة المقاومة للمضادات الحيوية وإيجاد التشابه والتماثل بين العزلات البكتيرية .
3- الكشف عن المصادر الحقيقية للعزلات والمسببة للخراريج البكتيري بطريقة البصمة الوراثية.

المواد وطرق العمل

جمع العينات وتشخيصها :

تم تجميع (247) عينه بيئية ومرضية من بيئات مختلفة وقد شملت العينات 48 عينة من الأدرار ، 69 عينة من أصابات الجروح والحروق ، 36 عينة من قشع المصابين بذات الرئة ، 19 عينة مياه صرف صحي ، 38 عينة من مياه الأسالة ، 16 عينة من التربة الزراعية ، 21 عينة من تربة حقول الدواجن . وزرعت العينات مباشرة بطريقة التخطيط على بيئات مزرعية مناسبة مثل بيئة أجار الماكونكي وبيئة أجار الدم لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37م ثم نقيت المستعمرات على بيئة الأجار المغذي Nutrient agar للحصول على مستعمرات نقية .وبعد الزرع الأولي للعينات تم تشخيص 46 عزلة

بكتيرية عائدة لجنس *Klebsiella spp.* بالأعتماد على المصادر العلمية المتبعة لتشخيص البكتيريا [9] والفحوصات المجهرية والأختبارات الكيموحيوية التي شملت :

- فحص الأوكسيديز.
- فحص الكاتاليز.
- فحص الحركة .
- أنتاج أنزيم اسالة الجيلاتين .
- فحص أستهلاك السترات .
- أنتاج الأندول .
- أنتاج أحمر المثيل .
- فحص فوكس بروسكاور .
- أختبار Kligler iron agar .

فضلاً عن التشخيص بأستخدام نظام Api 20E والتشخيص بجهاز الفايتك .

أختبار الحساسية للمضادات الحيوية:

أختبرت حساسية جميع العزلات البكتيرية تجاه 9 مضادات حيوية ذات تراكيز قياسية مختلفة (Cefotaxime , Tetracycline , Chloramphenicol , Gentamycin , Amikacin , Augmentin , Aztreonam , Imipenem , Ciprofloxacin)، وذلك بأتباع طريقة الأنتشار بالأقراص Disc Diffusion Method وبالأعتماد على طريقة (Bauer-Kirby,1966) ، ومن نتائج الحساسية تم أختيار العزلات الأكثر مقاومة للمضادات الحيوية للتحري عن عوامل ضراوتها والكشف عن الجينات المسؤولة عن صلة القرابة .

التحري عن عوامل الضراوة :

- التحري عن المحفظة Capsuleبأستخدام صبغة النكروسين Nigrosin stain .
- التحري عن الأنزيم المحلل للدم (الهيمولايسين) Hemolysin بأستخدام وسط Blood agar .
- التحري عن أنتاج أنزيم تحلل اليوريا Urease enzyme بأستخدام وسط أجار اليوريا المائل .
- التحري عن أنتاج حاملات الحديد Siderophores بأستخدام وسط M9 .
- التحري عن تكوين الغشاء الحيوي Biofilm بطريقة الأليزا ELIZA وطريقة الأنابيب Tube method .

دراسة المحتوى الوراثي للعزلات البكتيرية:

- **أستخلاص وتنقية المادة الوراثية DNA Extraction and purification of genomic :**
- أستخلصت عينات المادة الوراثية للعزلات البكتيرية المقاومة للمضادات الحيوية البالغ عددها 18 عزلة بكتيرية وفق طريقة الأستخلاص المعتمدة من قبل الشركة المجهزة (Genomic DNA Mini Kit, Geneaid,Thailand) .

- **توصيف المادة الوراثية Characterization of DNA :**

تم قياس تركيز ونقاوة الـ DNA بأستخدام جهاز النانودروب Nano drop instrument وذلك بأخذ 2 مايكروليتير من عينة الـ DNA ووضعها على عدسة الجهاز لتقدير تراكيز الـ DNA وقياس درجة نقاوته [10].

- **التفريد الكهربائي للمادة الوراثية على جيل الأجاروز Agarose gel electrophoresis of DNA:**

يتم فصل وتفريد المادة الوراثية DNA كهربائياً على جيل الأجاروز وفق ماجاء في [11] .

الخطوات الرئيسية	درجة الحرارة	المدة	عدد الدورات
Initial denaturation	95°C	(4min)	1
Denaturation	94°C	(30sec)	30
Denaturation	92°C	(30sec)	
Annealing	50°C	(1min)	
Extension	65°C	(4min)	
Final extension	65°C	(8min)	1

جدول (1) خطوات البرنامج المستعمل في تفاعلات BOX-PC

- **تفاعل السلسلة المتبلمر Polymerase Chain reaction (PCR) :**

أستخدمت تقنية تفاعل السلسلة المتبلمر PCR لتضخيم أجزاء مختلفة من جينات محددة وهي جينات القرابة ، حيث أستخدم البادىء (5′- CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3′) حيث أستخدم البادىء نفسة امامي وعكسي المصنع من قبل الشركة المنتجة في هذه التجربة ، وتم مزج DNA المستخلص والبرايمير PCR premix المحفوظ بدرجة حرارة 4 م في أنبوبة خاصة بواسطة جهاز المازج Vortex ، ثم يعمل لها طرد مركزي لضمان نزول المحتويات أسفل الأنبوبة بعدها تم أختيار التفاعل الأمثل لأجراء تجربة تفاعل السلسلة المتبلمر ، حيث تم أختيار الحجم المناسب من العينة حيث أن الحجم المختار 50 مايكروليتير وشملت 12 مايكروليتير من البرايمير بتركيز (10 Picomole / مايكروليتير) و15 مايكروليتير من الـ DNA المستخلص بعدها تم تكملة الحجم بأضافة الماء المقطرثم مزجهما جيداً وتوضع في المكان النهائي لجهاز PCR مع ضبط درجة الحرارة وعدد الدورات. وبعد أنتهاء وقت البرنامج المستعمل تم أجراء الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل والجدول (1) يوضح البرنامج المستخدم .

النتائج والمناقشة

العزل والتشخيص

بينت نتائج الدراسة الحالية والتشخيص المظهري والفحوصات الكيموحيوية أن 46 عينة فقط أعطت نمواً موجباً وبنسبة 18.6 % بينما أظهرت 201 عينة أي بنسبة 81.4 % نمو سالب وقد يعود السبب في عدم ظهور عزلات بكتيرية إلى أحتمالية المعالجة بمضادات حيوية قد تكون لها الأثر في خفض نسب البكتيريا المعزولة .

وتوزعت العزلات كما موضح في الجدول (2) وتم الحصول في هذه الدراسة على ثلاث أنواع من بكتيريا *Klebsiella spp* معزولة من عدة مصادر ، حيث وجدت 21 عزلة من بكتيريا *Klebsiella pneumonia* وبنسبة 45.7 % و15 عزلة بكتيرية من بكتيريا *Klebsiella planticola* بنسبة 32.6 % و10 عزلات من بكتيريا *Klebsiella oxytoca* أي بنسبة 21.7 % .

كما يوضح الجدول (3) أن عدد بكتيريا *Klebsiella pneumonia* في عينات الأدرار هو 9 عزلات وبنسبة 19.7 % من العدد الكلي للبكتيريا والبالغ 46 ، وهذ النتيجة مقاربة إلى النتيجة التي توصل إليها العالم (الزبيدي) [12] إذ كانت نسبة *Klebsiella pneumonia* في عينات الأدرار 21.8 % ، وكان عدد بكتيريا *Klebsiella oxytoca* 6 عزلات وبنسبة 13 % أما بالنسبة لمسحات الجروح والحروق فكانت أعلى نسبة لبكتيريا *Klebsiella pneumonia* إذ كان عددها 6 عزلات بنسبة 13 % ويعود السبب إلى أنتشار هذه الجراثيم في بيئات المستشفيات حيث أنها تعد من أكثر الأنواع تفشياً وأنتشاراً في المستشفيات لقدرتها على تطوير وسائل مختلفة لمقاومة المطهرات ويعزى السبب أيضاً إلى تباين نسب وجود هذه البكتيريا . كما تقاربت النتائج التي تم الحصول عليها مع النتائج التي حصل عليها الباحثان [13] ، وكانت نتائج الدراسة غير مطابقة أيضاً لنتائج [14] أما بكتيريا *Klebsiella oxytoca* فكان عددها عزلة واحدة وبنسبة 2.2 % كذلك بلغ عدد عزلات بكتيريا *Klebsiella planticola* 5 عزلات وبنسبة 10.9 % .

جدول (2) أعداد بكتيريا *Klebsiella* spp المعزولة من عينات سريرية وبيئية مختلفة

نوع العينة	عدد العينات	النسبة المئوية	عدد بكتريا *Klebsiella spp*
أدرار	48	% 19.4	15
جروح وحروق	69	% 28	12
قشع	36	% 14.5	3
ماء صرف صحي	19	% 7.7	7
ماء إسالة	38	% 15.4	1
تربة زراعية	16	% 6.5	3
تربة حقول الدواجن	21	% 8.5	5

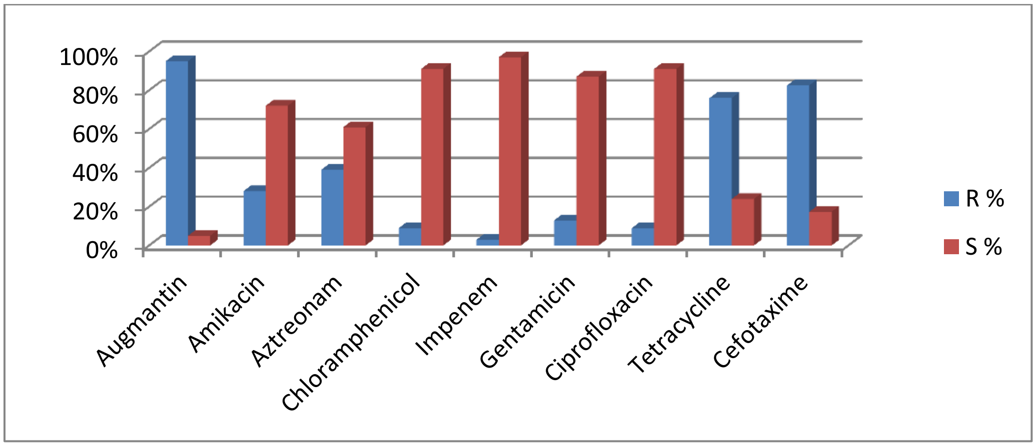
جدول (3) أعداد ونسب أنواع بكتيريا *Klebsiella spp* المعزولة من مصادر مختلفة

العينات	*K.pneumoniae*	*K.oxytoca*	*K.planticola*
أدرار	9 (19.7 %)	6 (13 %)	—
جروح وحروق	6 (13 %)	1 (2.2 %)	5 (10.9 %)
قشع	3 (6.5 %)	—	—
تربة زراعية	—	—	3 (6.5 %)
تربة حقول الدواجن	1 (2.2 %)	2 (4.3 %)	2 (4.3 %)
ماء إسالة	—	—	1 (2.2 %)
ماء صرف صحي	2 (4.3 %)	1 (2.2 %)	4 (8.7 %)
المجموع	21 (45.7 %)	10 (21.7 %)	15 (32.6 %)

حساسية العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية

درست حساسية العزلات البكتيرية والبالغ عددها 46 عزلة لـ 9 مضادات حيوية وبينت النتائج الموضحة في الشكل (1) والجدول (4) أن هناك تباين في العزلات بالنسبة لمقاومتها للمضادات الحيوية فوجد أن العزلات كانت مقاومة لمضاد Augmentin (خليط من مثبط الأنزيم Amoxicillin , Clavulinic acid) بنسبة 95 % وهذه النتيجة مقاربة للنتيجةالتي تحصل عليها (فليح) [15] إذ كانت العزلات مقاومة إتجاه هذا المضاد بنسبة 100 % ولم تتفق هذه النتيجة مع نتيجة (النعيمي) [16] إذ كانت العزلات مقاومة بنسبة 35 % ، وقد تعود هذه المقاومة العالية إلى الاستعمال العشوائي للمضادات الحيوية من قبل المرضى [17] وأستخدامهم للتطبب الذاتي Self-medication من عناصر غير مؤهلة طبياً . كما لوحظ أن العزلات مقاومة بنسبة 39 % من مجموع العزلات الكلية إتجاه مضاد Aztreonam وهذه النتيجة مقاربة لنتائج

(الزنكنة) [18]، إذ بلغت مقاومة العزلات لهذا المضاد بنسبة 45.5 % . أما بالنسبة لمضاد Cefotaxime وجد أن مقاومة البكتيريا لهذا المضاد كانت بنسبة 82.6 % وجاءت هذه النتيجة مطابقة لنتيجة (Qasim) [19] إذ بلغت نسبة المقاومة إتجاه هذا المضاد 82 % ، وقد يعود سب المقاومة إلى حدوث تغير في حاجز النفاذية إذ يحتوي الغشاء الخارجي للبكتيريا قنوات بروتينية تدعى البورين تعمل على منع دخول المضادات إلى داخل الخلية البكتيرية [20]. في حين سجلت العزلات البكتيرية حساسية كبيرة إتجاه مضاد Imipenem فقد كانت نسبة مقاومة العزلات لهذا المضاد 3 % ، أما بالنسبة لمضادات مجموعة الأمينوكلايكوسيدية Gentamycin ، ومضـاد Amikacin فـقد كانت نسبة مقاومتها 13 % ، 28 % على التوالي ، وجاءت هذه النتائج مقاربة لما توصل إليه (العتبي) [21] بالنسبة لمضاد Gentamycin الذي بلغت مقاومة العزلات له 16 % ، وفيما يخص مضادات مجموعة الكوينولينات Ciprofloxacin فقد سجلت العزلات البكتيرية حساسية إتجاه هذا المضاد فقد بلغت نسبة المقاومة لهذا المضاد 9 % وهي نتيجة غير مطابقة لنتائج (الخفاجي) [22] التي بلغت نسبة المقاومة له 100 % .كما بلغت نسبة حساسية العزلات البكتيرية قيد الدراسة لمضادات مجموعة الفنيكول كمضاد Chloramphenicol 91 % ، أما مضاد Tetracycline فوجد أن نسبة مقاومة العزلات البكتيرية له 76 %.



الشكل (1) النسبة المئوية لحساسية ومقاومة بكتيريا *Klebsiella sp* تجاه 9 مضادات حيوية

جدول (4) حساسية العزلات البكتيرية ومقاومتها للمضادات الحيوية

المضادات الحيوية	بكتيريا *Klebsiella spp* No:(46)	
	R %	S %
Augmentin 30 mg/disk	(% 95) 44	(% 5) 2
Amikacin 30 mg/disk	(% 28) 13	(%72) 33
Aztreonam 30 mg/disk	(% 39) 18	(% 61) 28
Chloramphenicol 30 mg/disk	(% 9) 4	(% 91) 42
Imipenem 10 mg/disk	(% 3) 1	(%97) 45
Gentamicin 10 mg/disk	(% 13) 6	(% 87) 40
Ciprofloxacin 5 mg/disk	(% 9) 4	(% 91) 42
Tetracycline 30 mg/disk	(% 76) 35	(% 24) 11
Cefotaxime 30 mg/disk	(% 82.6) 38	(% 17.4)

التحري عن عوامل الضراوة:

1. أنتاج المحفظة Capsule Production :

بعد أجراء الفحص المجهري للعزلات البكتيرية قيد الدراسة وذلك بأستخدام صبغة النكروسين وجد أن جميع عزلات بكتيريا الكليبسيلا *Klebsiella* المنتخبة البالغ عددها 18 عزلة بكتيرية وهي الأكثر مقاومة للمضادات الحيوية تحتوي على المحفظة Capsule وبنسبة 100 % لظهور الخلايا البكتيرية بشكل عصيات محاطة بهالة من الخارج حيث انها تعد أحد الصفات التشخيصية للبكتريا وعامل ضراوة مهم وأساس لإصابات هذه البكتيريا ، فانها تحميها من عملية البلعمة Phagocytosis [23].

2. أنتاج الهيمولايسين Hemolysin Production :

أختُبرت قابلية العزلات البكتيرية على أنتاج أنزيم الهيمولايسين الذي يُعّد من عوامل الضراوة الاساس وأحد العوامل المهمة التي تنتُجها البكتيريا للحصول على ماتحتاجه من الحديد ، وجد أن جميع عزلات بكتريا الكليبسيلا *Klebsiella* ليس لها القدرة على أنتاج أنزيم الهيمولايسين ، ولم تتفق النتيجة مع (السعيد) [24] الذي أشار إلى ظهور عزلتين فقط من عزلات بكتريا الكليبسيلا منتجة لأنزيم الهيمولايسين من مجموع 20 عزلة بكتيرية . أن وظيفة أنزيم الهيمولايسين تتمثل بتوفير عنصر الحديد الضروري لنمو البكتريا ، وأن عدم أنتاج عزلات الكليبسيلا لهذا الأنزيم قد يعود إلى أمتلاكها أنظمة خاصة لسحب الحديد تدعى بـ Aerobactim [25].

3. التحري عن أنتاج السايدروفور Siderophore production

تم التحري عن قابلية عزلات بكتيريا الكليبسيلا *Klebsiella* على تخليق أنظمة نقل الحديد المتمثلة بالسايدروفور Siderophore وبينت النتائج أن نسبة أنتاج السايدروفور من قبل العزلات البكتيرية كانت 100 % وهذه النتيجة أتفقت

مع ماتوصل إليه (خلف وجرجس) [26] إذ وجدا أن جميع العزلات البكتيرية للكليبسيلا لها القدرة على أنتاج حاملات الحديد وبنسبة 100 %.

4. أنتاج أنزيم اليوريز Urease production

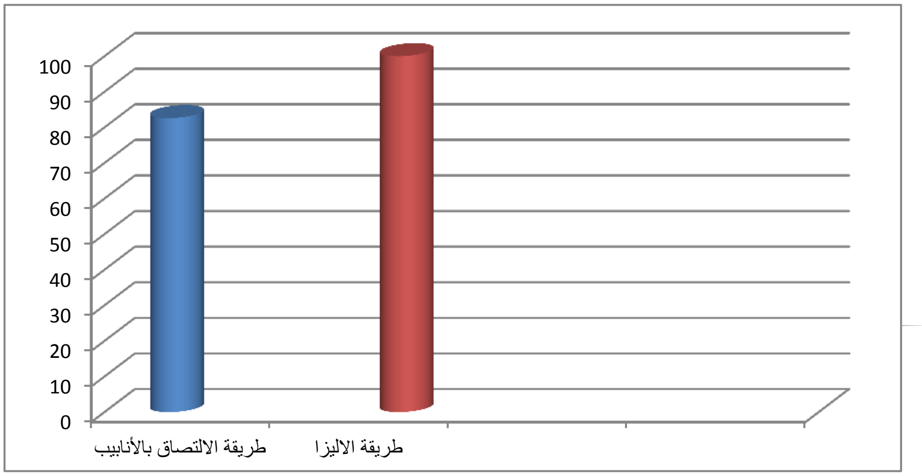
يُعّد أنزيم اليوريز عاملاً مهماً من عوامل ضراوة البكتيريا حيث أختبرت قابلية العزلات البكتيرية على أنتاجها لهذا الأنزيم وأوضحت النتائج أن جميع عزلات بكتيريا *Klebsiella spp* لها القدرة على أنتاج أنزيم اليوريز وبنسبة 100 % وأتفقت هذه النتيجة مع النتائج التي توصل إليها (علي) [27] إذ كانت جميع عزلات الكليبسيلا منتجة لهذا الأنزيم وبنسبة 100 % حيث أنه عامل مهم تحتاجه البكتريا للتحلل اليوريا وتحرير الأمونيا القاعدية NH4 [28] .

جدول (5) قابلية العزلات على أنتاج بعض عوامل الضراوة

عوامل الضراوة	عدد العزلات المنتجة	النسبة المئوية
أنتاج المحفظة	18	% 100
أنتاج الهيمولايسين	0	0
أنتاج السايدروفور	18	% 100
أنتاج أنزيم اليوريز	18	% 100
عدد العزلات الكلي	18	

5. التحري عن أنتاج الغشاء الحيوي Biofilm production

أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (2) أن طريقة الأليزا هي الأفضل في الكشف عن أنتاج الغشاء الحيوي وأن جميع العزلات لها القدرة على أنتاج الغشاء الحيوي وبنسبة 100 % بطريقة الأليزا وبمعدلات أنتاج مختلفة تراوحت بين المتوسط والضعيف ، وأتفقت هذه النتائج مع النتيجة التي جاءت بها (Sanna) [29] كما تم التحري عن أنتاج الغشاء الحيوي بطريقة الألتصاق بالأنابيب حيث بلغت نسبة أنتاج الغشاء الحيوي بهذه الطريقة 83.3 % وقد جاءت هذه النتيجة مطابقة لما توصل إليه (Moteeb) [30].

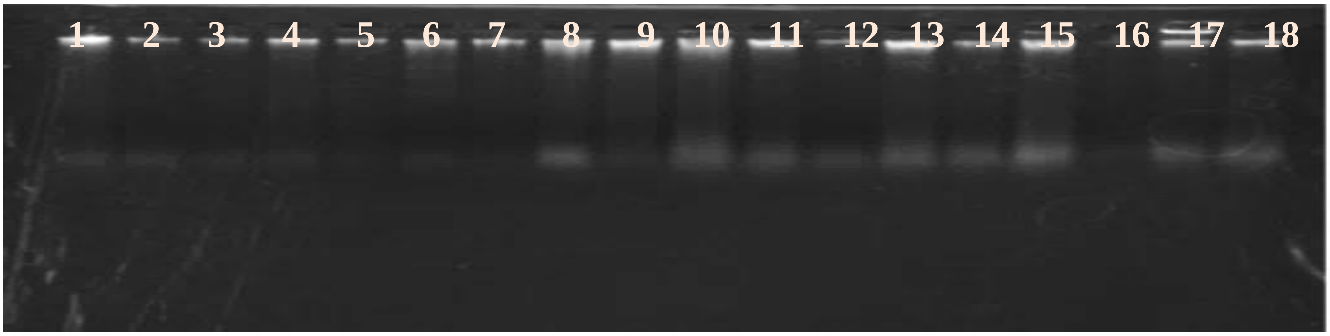


الشكل (2) النسبة المئوية لطرق التحري عن الغشاء الحيوي

المحتوى الوراثي للعزلات البكتيرية قيد الدراسة :

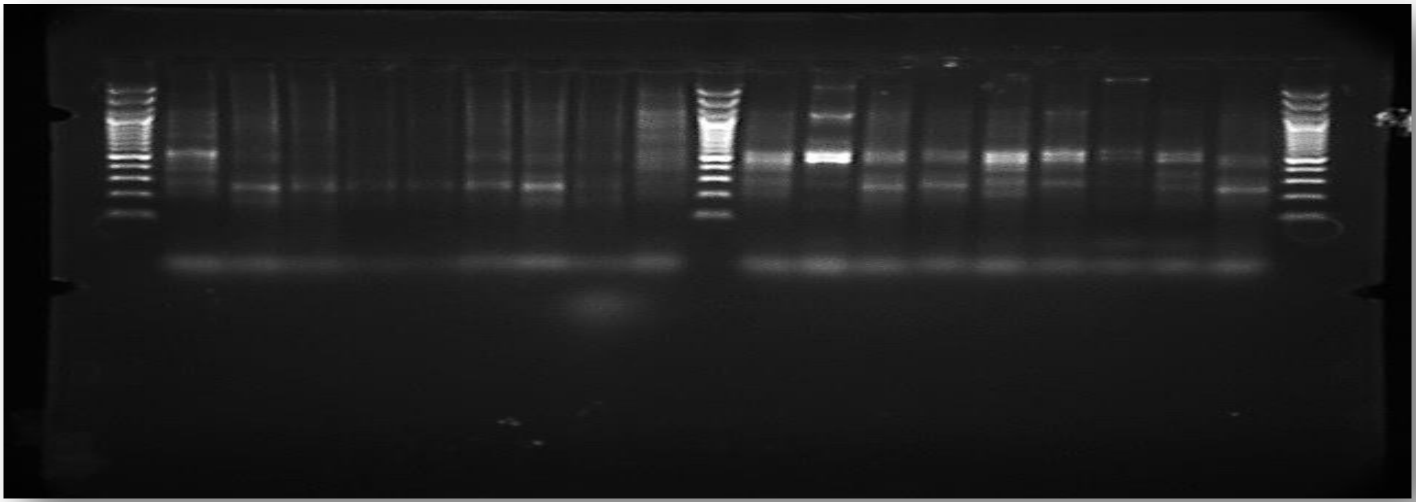
بعد أستخلاص الـ DNA لثمانية عشر عزلة مرضية وبيئية وتفريد الـDNA المستخلص على جيل الأجاروز بينت النتائج أحتواء جميع العزلات البكتيرية المنتخبة على الحزم كما في الصورة (1) وبعد استخدام طريقة Box-PCR لمعرفة التباينات الجينية المختلفة للعزلات البكتيرية

تركيز هلام الأجاروز 1.5 % ، 80 فولت / سم لمدة 90 دقيقة

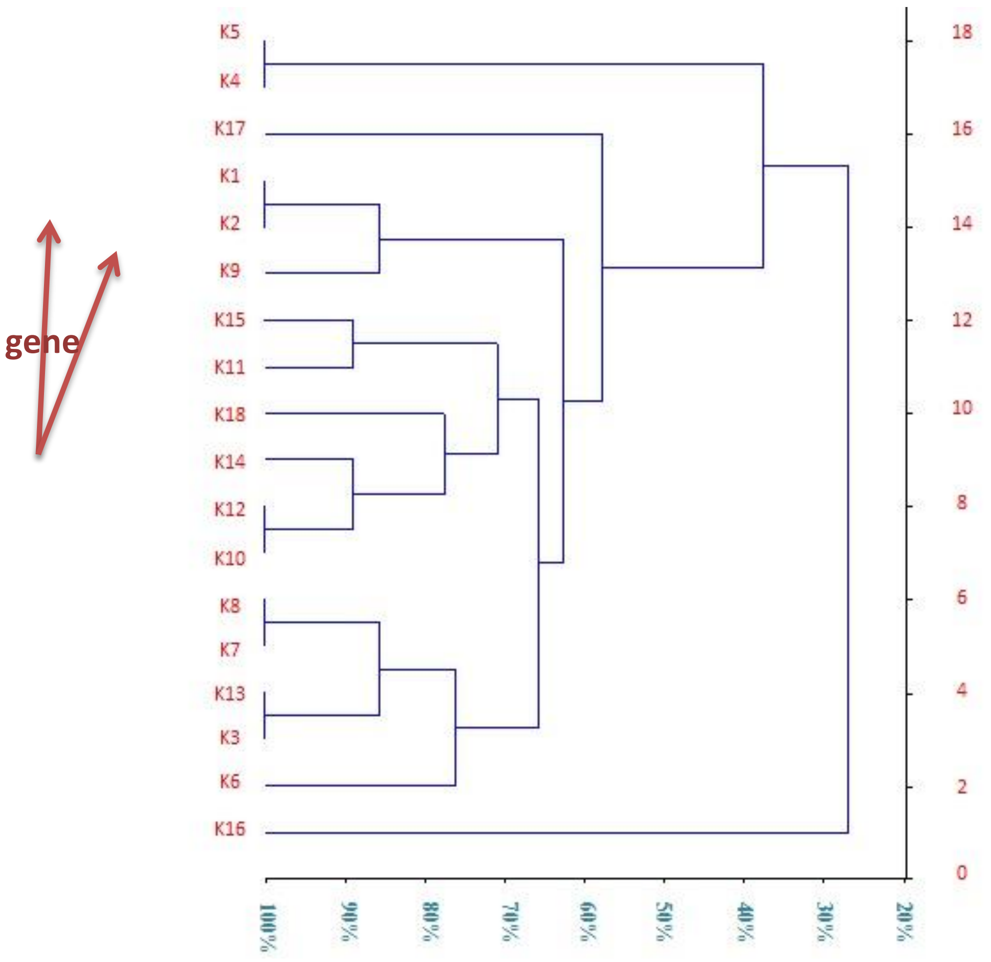


صورة (1) الترحيل الكهربائي للـ DNA الجينومي المستخلص من عزلات بكتيريا *Klebsiella*

وترحيل الناتج على جيل الأجاروز اظهرت الحزم الناتجة من التفاعل وجود العديد من الجينات في العزلات البكتيرية وقد تباينت العزلات في أحتوائها على الجينات كما في الصورة (2) . وبعد تحليل البيانات التي ظهرت في الصورة أدناه بأستخدام برنامج أحصائيكما في الشكل (3) وجد أن هناك تباينات واضحة ما بين العزلات في درجة تشابها وتقاربها مع بعضها بالرغم من اختلاف مصادر عزلها حيث بلغ المعدل العام للتشابه الوراثي 64% وبذلك فان مصدر الاخمأج البكتيرية قد تكون نتيجة ملامسة التربة اوالماء لذا يجب على الاشخأص الذين بتماس دائم ومباشر مع التربة والماء أخذ الحذر لأمكانية انتقال هذة البكتريا اليهم .



صورة (2) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل لسلسلة الـ DNA بأستعمال نظام BOX – PCR ، M: الدليل الحجمي ،(1 – 9) أرقام العزلات المرضية ، (10 – 18) أرقام العزلات البيئية للـ *Klebsie*



الشكل (3) التحليل الاحصائي لثمانية عشر عزلة بكتيريا

أهم النتائج و الخلاصة

خلال الفترة الممتدة من كانون الثاني 2016 حتى أيار 2016 .عزلت العينات على وسط أكار الماكونكي ووسط أكار الدم ثم تم تنقيتها على وسط الأكار المغذي للحصول على مستعمرات نقية. وقد بينت نتائج الزرع البكتيري والتشخيص المظهري والفحوصات المجهرية والكيموحيوية ونظام Api 20E وجهاز الفايتك أن 46 عزلة تعود إلى بكتيريا Klebsiella spp وبنسبة 18.6 % من المجموع الكلي للعينات بواقع 21 عزلة من بكتيريا K.pneumoniae وبنسبة 45.7 % و15 عزلة تعود إلى بكتيريا K.planticola بنسبة 32.6 % و10 عزلات عائدة إلى K.oxytoca بنسبة 21.7 % . وأختبرت حساسية عزلات بكتيريا Klebsiella تجاه 9 مضادات حيوية بأستخدام طريقة الأنتشار بالأقراص ، وقد أظهرت النتائج أن 44 عزلة (95

%) مقاومة لمضاد Augmantin و38 عزلة (82.6 %) مقاومة لمضاد Cefotaxime وأبدت العزلات أيضاً مقاومتها للتراسايكلين بنسبة 76 % ، كما أظهرت العزلات حساسية جيدة أتجاه كل من المضادات , Imipenem , Imikacin , Chloramphenicol , Aztreonam Gentamicin , Ciprofloxacin مما يجعلها العلاج الأفضل لأخماج هذه البكتيريا. ومن نتائج المقاومة والحساسية للمضادات الحيوية تم أختيار 18 عزلة بكتيرية مقاومة للمضادات الحيوية بواقع 9 عزلات مرضية و9 عزلات بيئية لدراسة بعض عوامل الضراوة المتمثلة بوجود المحفظة وقدرتها على أنتاج أنزيم الهيمولايسين وأنزيم اليوريز وأنتاج السايدروفور وقابليتها على تكوين الغشاء الحيوي بطريقة الاليزا وطريقة الألتصاق بالأنابيب وقد وضحت نتائج التحري عن عوامل الضراوة لبكتيريا الكليبسيلا أن جميع العزلات محاطة بالمحفظة Capsule وبنسبة 100 % وتميزت العزلات أيضاً بعدم قدرتها على أنتاج أنزيم الهيمولايسين بينما أمتلكت القابلية على أنتاج السايدروفور وأنزيم اليوريز بنسبة 100 % كما بلغت نسبة أنتاج الغشاء الحيوي بطريقة الأليزا 100 % بينما بلغت نسبة أنتاجها للغشاء الحيوي بطريقة الأنابيب 83.3 %.

وبإستخدام تقنية تفاعل السلسلة المتبلمر (PCR) تم التحري عن الجينات المسؤولة عن صلة القرابة مابين العزلات وذلك بتضخيم أجزاء مختلفة من الجينات حيث بينت النتائج أن هناك تباين مابين العزلات البكتيرية . فبعض العزلات تشابهت بنسبة 100 % وبعضها تراوحت معدلات تشابهها الوراثي مابين 72 % ، 87% ، 78% ، 65% ، 62 ، 58% وبلغ معدل التشابه الوراثي الكلي للعزلات البيئية والمرضية 64 % .

المراجع :

1. **Chan, Y.; Liu, J.; Pociask, D.; Zheng, M.; Mietzner, T. and Berger, T.** Lipocalin 2 is required for pulmonary host defense against Klebsiella infection. J Immunol. 182(8) 47 – 56 **2009 .**
2. **Sharmeen, R. , Hossain, N. , Rahman, M. , Foysa, J. and Miah, F.** ; In-vitro antibacterial activity of herbal aqueous extract against multi-drug resistant Klebsiella sp. isolated from human clinical samples . International Current Pharmaceutical .J., 1(6): 133-137 **2012**.
3. **Hart, C.A.** *Klebsiellae and neonates*. J. Hosp. Infect. 23: 83-86 **1993**.
4. **Dillon, R.; C. Vennard and A. Charnley.** a note: Gut bacteria produce components of a locust cohesion pheromone. J. Appl. Microbiol. 92(4): 59 -67 **2002** .
5. **Brooks, G.F.; ButeL, J.S. and Morse, S.A.** *Medical Microbiology*. 22 th. Appleton and Lange **2001.**
6. **Naas, T; Zerbih, M; Girlich, D.; Nordmann, P.** Integration of Transposon Tn1- Encoded inhibitor resistant β -Lactamase Gene blaTEM-67 from Proteus mirabilis,, into the Escherichia coli chromosome. J. Antimicrob. Chemoth. 47 (1): 19-20 **2003**.

7. **Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A. K., Wertheim, H. F., Sumpradit, N., ...& Greko, C .** Antibiotic resistance the need for global solutions. The Lancet infectious diseases, 13(12), 1057-1098 **2013**.

8. **Woodford, N.,Turton,J.F.,& Livermore, D.M.** Multiresistant Gram-negative bacteria : the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. FEMS microbiology reviews , 35(5) ,736-755 **2011**.

9. **MacFaddin, J.F.** *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3rd edition Lippincott, Williams and Wilkins. Philadelphia. London* **2000**.

10. **Sambrook, J.; Fritgah, E. and Maniatis, T. ()** .*Molecular coloing, alabratory manual,* cold spring Harbory. New York **1989 .**

11. **Ausubel FM, Brent R. & Kingston R.E.** *Short Protocols in Molecular Biology* , 3rd edn. John Wiley & Sons,New York **1995**.

12. **الزبيدي ، محمد مهدي عبدالمحسن .** دور البلازميدات في أنتاج البكتريوسين من بكتيريا *Klebsiella spp.* المعزولة من عينات سريرية . رسالة ماجستير ، معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الأحيائية ، جامعة بغداد **2012** .

13. **Qader, A. R. and Muhamad, J. A.** ; Nosocomial infection in Suliamani Burn Hospital , Iraq.Annuls of Burns and fire Diastersvol.17(4):177- 181 **2010** .

14. **Al-Charrakh,A.H., Yousif, S.Y., & Al-Janabi, H.S** .Antimicrobial spectrum of the action of bacteriocins from *Klebsiella* isolates from Hill/Iraq.J. Microbiol,2, 1-11 **2011.**

15. **فليح ، عمر نعمة .** عزل وتشخيص البكتيريا المسببة لأخماج الجروح والحروق ودراسة بعض عوامل ظراوتها وراثياً . رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة الأنبار **2016** .

16. **النعيمي ، أبتهال محمد زاهد .** الأخماج البولية عند النساء الحوامل . رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية **2002**.

17. **Lewis, Ronald T.** "Oral versus systemic antibiotic prophylaxis in elective colon surgery : a randomized study and meta-analysis send a message from the 1990s."Canadian journal of surgery 45.3: 173 **2002 .**

18. **الزنكنة ، إيمان عباس علي .** دراسة بكتريولوجية ووراثية لبكتيريا *Klebsiella spp* المعزولة من أصابات مرضية مختلفة . رسالة ماجستير ، كلية التربية للعلوم الصرفة ، جامعة ديالى **2012**.

19. **Qasim,F.G.** Detection of acrA and ramA genes and Antibiotic susceptibility in Klebsiella pneumoniae isolated from Clinical Samples.M.S thesis college of science, Al-Mustansiryah University **2015**.

20. **Spanu, T.; Luzzaro, F.; Perilli, M.; Amicosanti, G.; Toniolo, A.; Fadda, G. and the Italian ESBL study group .** Occurance of extendedspectrum-B. lactamas and other antimicrobial drug. Antimicrobial Agent and Chemotherapy. Jun .46 (1) : 196 – 202 **2002 .**

21. **العتبي ، دعاء عدنان كاظم** . دراسة بكتيريولوجية لبعض أنواع العائلة المعوية المعزولة من صالات مستشفى الولادة في مدينة بعقوبة . رسالة ماجستير، كلية التربية للعلوم الصرفة ، جامعة ديالى **2013** .

22. **الخفاجي ، مروى حميد مطشر**. تكون الغشاء الحيوي بوساطة *Klebsiella pneumonia* الملوثة للمثبتات الخارجية ومقاومته لمضادات الحياة . رسالة ماجستير، كلية العلوم ، جامعة بغداد **2008** .

23. **Clements, A. , Gaboriaud, F. , Duval,J. F. L. , Farn, J. L. , Jenney, A. W. , Lithgow, T. , Wijburg, O. L. C. , Hartland, E. L. , Strugnell, R. A.,** The Major Surface-Associated Saccharides of Klebsiella pneumoniae Contribute to Host Cell Association. PLoS ONE 3(11):1-10 2008

24. **السعيد ، محمد صبري عبدالرزاق** . الأصابات البكتيرية الهوائية لأعلى الجهاز التنفسي في محافظة بابل ودراسة النسق الوراثي لبكتيريا الكليبسيلا . رسالة ماجستير، كلية العلوم ، جامعة بغداد **1997** .

25. **Opal, S.M; Cross, A.S; Genski, P. and Lyhte, L.W.** *Aerobactin and hemolysin as virulence determinants in Eschericha coli Isolated from human blood , Urine and stool.* **1990**

26. **خلف ، صبحي حسين. جرجس ، شاكر غازي** . التحري عن حاملات الحديد المعزولتين Klebsiella pneumonia ، Staphylococcus aureus في جرثومتي من حالات التجويف الأنفي ، جامعة الموصل ، مجلة أبحاث كلية التربية الأساسية ، مجلد 11 ، العدد 2 ، 21- 39 **2011**.

27. **علي ، منى جلال** . دراسة عوامل الضراوة للجراثيم المسببة لألتهاب المهبل البكتيري لدى النساء . مجلة ديالى للعلوم الصرفة . مجلد 1 ، العدد7 ، 58 – 72 **2011**.

28. **Friedrich , A.W.; Koch , R.; Bielasz ewska,M.; Zhang, W.; Karch ,H. and mathys , W.** Distribution of the urease gene cluster among and urea activity of enterohemorrhagic Escherichia coli 0157 Isolateds from humans . J. of Clinical Microbiology . 43(2) :46-50 2005.

29. **Sanaa R. Oleiwi; Huayda K. Abid** ."Role of Extracted Genomic DNA on Biofilm Formation by Pseudomonas aeruginosa and *Klebsiella pneumonia* in vitro."Ibn Al-Haitham Jour.for Pure & Appl. Sci. 27(3): 35 - 51 **2014**.

30. **Moteeb, Sh. H .** Quantitative and Qualitative Assayes OF Bacterial Biofilm Produced By Pseudomonas aeruginosa AND Klebsiella spp. J. of al-anbar university for pure science : 23 : 45 – 62 **2008** .