وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية / كلية التربية

قسم علوم الحياة

التوصيف المظهري والجزيئي و نمط المقاومة لبكتريا *Enterobacter cloacae* المعزولة من حالات سريرية مختلفة

أطروحة مقدمة الى مجلس كلية التربية / جامعة القادسية

وهي من متطلبات نيل شهادة دكتوراه فلسفة علوم في

علوم الحياة / الأحياء المجهرية

من

صفاء منعم سلمان

ماجستير علوم حياة / أحياء مجهرية 2014

إشراف

أ. د. أزهار نوري حسين الموسويّ

1439 هـ **2018 م**

إقرار لجنة المناقشة

نشهد نحن أعضاء لجنة المناقشة الموقعين في ادناه بأننا قد اطلعنا على الاطروحة الموسومة بـ (التوصيف المظهري والجزيئي و نمط المقاومة لبكتريا *Enterobacter cloacae* المعزولة من حالات سريرية مختلفة) وناقشنا الطالب (صفاء منعم سلمان) في محتوياتها وفيما له علاقة بها بتاريخ 2018/9/5 فوجدناها جديرة لنيل درجة دكتوراه فلسفة في علوم الحياة / أحياء مجهرية بتقدير (امتياز) .

رئيس اللجنة
التوقيع :
الاسم : أ.د. ماجد كاظم عبود
العنوان : جامعة القادسية / كلية التربية
التاريخ : ٧/ ٩/ 2018

عضو اللجنة
التوقيع :
الاسم : أ.د. بهيجة عبيس حمود
العنوان : جامعة القادسية / كلية التمريض
التاريخ : ٨/ ٩/ 2018

عضو اللجنة
التوقيع :
الاسم : أ.د. ميادة فرحان درويش
العنوان : جامعة الكوفة / كلية العلوم
التاريخ : ٧/ ٩/ 2018

عضو اللجنة
التوقيع :
الاسم : أ.د. دينا محمد رؤوف
العنوان : جامعة القادسية / كلية التربية
التاريخ : ٧/ ٩/ 2018

عضو اللجنة
التوقيع :
الاسم : أ.م.د. أمل طالب عطية
العنوان : جامعة بابل / كلية الصيدلة
التاريخ : ٥/ ٩/ 2018

عضو اللجنة والمشرف
التوقيع :
الاسم : أ.د. أزهار نوري حسين
العنوان : جامعة القادسية / كلية الصيدلة
التاريخ : ١/ ١٠/ 2018

مصادقة كلية التربية – جامعة القادسية

التوقيع :
العميد : أ.د. خالد جواد العادلي
التاريخ : ٢/ ١٠/ 2018

الخلاصة /

تعد بكتريا *Enterobacter cloacae* ثالث نوع من البكتريا التابعة للعائلة المعوية المهددة لحياة الأنسان والقادرة على احداث مدى واسع من الأخماج من خلال امتلاكها لعوامل الضراوة كمقاومتها للعديد من المضادات الحياتية وانتاجها لإنزيمات البيتالاكتاميز مما يزيد من خطورتها ويقلل من نسب الشفاء منها لذا هدفت الدراسة الحالية الى تقييم نمط المقاومة البلازميدية او الكروموسومية لبعض المضادات الحياتية وانتاجها لانزيمات البيتالاكتام ودراسة العلاقة التطورية بين العزلات المحلية المعزولة في هذه الدراسة مع العزلات العالمية .

تضمنت هـذه الدراســة جمع 263 عينـة سريرية لمرضى راقدين في كل من مستشفى الديوانية للنسائية والأطفال التعليمي ومستشفى الديوانية العام التعليمي تراوحت اعمارهم ما بين أسبوع إلى 73 سنة للمدة من 2016/12/15 ولغاية 2017/7/18 لغرض عزل وتشخيص بكتريا *E. cloacae* وبالاعتماد على الفحوصات المظهرية والكيموحيوية والمجهرية واستخدام جهاز الفايتك Vitek2 system وأظهرت النتائج ان 25 عزلة (9.50%) تعود لبكتريا *E. cloacae* .

اختبرت حساسية عزلات هذه الدراسة تجاه 15 مضاد حياتي باستخدام طريقة الانتشار من الأقراص وبينت النتائج وجود مقاومة بنسبة 100% لمضادات الاموكسيلين ، والسيفالوثين ، والدوكسيسايكلين في حين تباينت حساسيتها تجاه مضادات الاميكاسين ، والجنتامايسين ، والتتراسايكلين ، و النايتروفيورانتوين ، وحامض الناليديكسك إذ كانت نسبة المقاومة لها 12% و36% و 76 % و 32% و 20% على التوالي ، اما ما يخص بقية مضادات مجموعة السيفالوسبورينات المتمثلة بـ : (السيفوكستين ، و السيفوتاكسيم ، والسفترياكسون) فقد كانت العزلات مقاومة لها وبنسبة 64% و 60% و36% على التوالي ، في حين كانت جميع العزلات حساسة لمضادات الكلورامفنيكول ، والسايبروفلوكساسين ، والامبنيم ، ، والميروبنيم وبنسبة 100% .

تم حساب التركيز المثبط الادنى (MIC) لعزلات الدراسة الحالية و بينت النتائج وجود مقاومة تامة لمضاد الاموكسيلين والسيفالوثين والفانكومايسين عند تراكيز (32≤) ملغم / مل على التوالي في حين كان MIC للسيفوتاكسيم وللسفترياكسون 4≤ ملغم / مل ، اما ما يخص لمضادات الكوينولون فقد كانت جميع العزلات حساسة للسايبروفلوكساسين وعندMIC 1 ≤ ملغم / مل في حين أظهرت 17عزلة حساسية لمضاد حامض الناليديكسك وعند MIC

16 ≤ ملغم / مل في حين أظهرت عزلات هذه الدراسة مقاومة مطلقة لمضاد Doxcyclin وعند MIC 16≤ ملغم / مل ومقاومة بعض العزلات للتتراسايكلين وعند MIC 16≤ ملغم / مل، في حين كانت MIC للكلورامفنيكول بين 8 ≤ ملغم / مل.

درست قابلية العزلات على انتاج أنزيمات البيتا لاكتام إذ وجد ان 24 عزلة (92.30 %) كانت منتجة لهذه الأنزيمات .

تم التحري عن مواقع المورثات المشفرة لمقاومة المضادات الحياتية باستخدام طريقة تحييد البلازميدات باستخدام املاح كبريتات دودسيل الصوديوم (SDS) إذ أمكن التخلص من الحزم البلازميدية للعزلات المعاملة ورافق ذلك فقدانها صفة المقاومة لأغلب المضادات التي قاومتها قبل عملية التحييد .

استخدمت تقنية تفاعل سلسلة البوليميريز Polymerase Chain Reaction (PCR) لتضخيم المورث *HSP60* الذي استخدم لتشخيص بكتريا *Enterobacter* sp. كما استخدم المورث نفسه لتحديد تتابع النيوكليوتيدات والتي استخدمت لرسم الشجرة التطورية وايجاد العلاقة بين عزلات الدراسة الحالية مع العزلات عالمية وكذلك التحري عن العزلات المحلية الطافرة من هذه البكتريا .

نستنتج من الدراسة الحالية ان لبكتريا *E. cloacae* المشخصة في مستشفيات محافظة القادسية في مدينة الديوانية دوراً كبيراً في إحداث الأخماج بما تمتلكه من قدرة على مقاومة أصناف مختلفة من المضادات الحياتية وانتاجها لأنزيمات البيتالاكتاميز ، وأن مضادات السايبروفلوكساسين والميروبنيم والامبنيم والكلورامفنيكول هي الأمثل حالياً لعلاج هذا النوع من الجراثيم . وأخيراً يعد المورث *HSP60* ذو دلالة معنوية في رسم الشجرة التطورية التي اظهرت وجود تطابق عالٍ بين هذه العزلات والعزلات العالمية وكذلك تحديد الطفرات الوراثية في هذه البكتريا .

Ministry of Higher Education and Scientific Research

University of AL-Qadisiyah / College of Education

Department of Biology

Study of phenotypic and molecular pattern of antibiotics resistance in *Enterobacter cloacae* Isolated from different clinical cases

A thesis

Submitted to the council of the College of Education

University of AL-Qadisiyah in Partial Fulfillment of the

Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy

Biology / Microbiology

By

Safaa Muniem Salman

Master of Biology / Microbiology – 2014

Supervised by

Prof. Dr. Azhar noory Hussien

2018 A.D 1439 A.H

Summary :

In the last years ,the risks and pathogenicity of *Enterobacter cloacae* increased due to their virulence and resisting for many antibiotics besides secretion of β-lactamases enzymes therefore this study aimed to assessment phenotypic , genotypic and resistance pattern and find the relationship among local *E.cloacae* isolates with global isolates.

Total of 263 samples from different clinical sources were collected from Al-dewaniya's hospitals for the period from 15/12/2016 to 18/7/2017. Twenty five isolates were identified as *E.cloacae* depending on the results of phenotypic and biochemical tests and the Vitek2 system .

All isolates in this study showed resistant to Amoxicillin, Cephalothine and Doxycycline against their sensitivity to Chloramphenicol, Ciprofloxacin, Impenem and Meropenem , while their sensitivity to other antibiotics(Amikacin , Gentamicin, Tetracycline, Nitrofurantoin , Nalidixic acid ,Cefoxitin, Cefotaxim and Ceftriaxone) were variable , besides 23 isolates (92%) had ability to produce β-lactamases enzymes when β-lactamases strips test were used.

MIC were calculated and the results showed resistant of these bacteria to Amoxicillin and Cephalothine at MIC ≥32 µg/ml and for Cefotaxim and Ceftriaxone MIC were at ≥ 4 µg / ml while MIC of Ciprofloxacin , Tetracyclines , Doxcyclin , Chloramphenicol and Vancomycin were at MIC (≤ 1, ≥16 , ≥16 , ≤8 and ≥32) µg / ml ,respectively .

The sites of the antibiotics resistance genes were investigated by curing plasmids method with using of sodium dodecyl sulfate salts (SDS). The plasmid bundles of the treated isolates were eliminated and the resistance to most of the antibiotics which they resisted it before the treated with SDS ,was lost .

Polymerase Chain Reaction (PCR) was used to amplify *HSP60* gene which used to determine the sequence of nucleotides of *Enterobacter* sp. to draw the phylogenic tree and look for mutations in local *E.cloacae* isolates.

From this study we concluded that *E. cloacae* which were identified in hospitals of Al-dewaniya city have a big role in happening of disease due to its ability to resist many of antibiotics and produce β-lactamases enzymes . Chloramphenicol, Ciprofloxacin, Impenem and Meropenem are the best antibiotics to treat infections caused by these bacteria besides *HSP60* gene is important tool to find evolutionary relationship among local and global isolates of *E. cloacae* and finding genetic mutation in these bacteria.