جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية

كلية العلوم – قسم البيئة

دراسة مقارنة حساسية بكتريا الكلبسيلا *Klebsiella* spp. المعزولة من عينات سريرية وعينات بيئية

بحث مقدم الى مجلس كلية العلوم – قسم البيئة /جامعة القادسية

وهو جزء من متطلبات نيل درجة البكالوريوس في علوم البيئة

مقدم من قبل الطالب

هشام ناظم واعي

بأشراف

أ.م.د. الاء فاهم عباس

1440 2019

بِسْمِ اللهِ الرَّحمنِ الرَحيمِ

يُؤْتِي الْحِكْمَةَ مَنْ يَشَاءُ وَمَنْ يُؤْتَ الْحِكْمَةَ فَقَدْ أُوتِيَ خَيْرًا كَثِيرًا وَمَا يَذَّكَّرُ إِلَّا أُولُو الْأَلْبَابِ

صَدقَ الله العلي العَظيم

{البقرة : 269}

الاهـــــــداء

الى امير الانسانية علي بن ابي طالب (عليه السلام) وحسبي به للخائفين ملاذاً ....

الى النافخ في صور الجهاد مرجع الامة الامام السيد السيستاني (حفظه الله)....

الى نظرات والدي التي اعشوشبت حبا وحنانا ...

الشـكر والتـــقدير

الحمد لله الذي انار لنا درب العلم والمعرفة وعاننا على هذا الواجب ووفقنا الى انجاز هذا العمل .

اتوجه بجزيل الشكر والامتنان الى الدكتورة الاء فاهم عباس التي لم تبخل علينا في توجيهاتها ونصائحها والتي كانت عوناً لنا في اتمام هذا البحث وفي تذليل ما واجهنا من صعوبات.

كما اتقدم بوافر الشكر والتقدير الى كادر مختبر الاحياء المجهرية في مستشفى القاسم لما قدموه من مساعدة كبيرة ساهمت في انجاز البحث.

واخيرا شكري وتقديري لكل من ساعدنا من قريب او بعيد على انجاز هذا البحث .

ومن الله التوفيق

قائمة المحتويات

ت	الموضوع	الرقم
.1	الخلاصة	1
.2	المقدمة	2
.3	الفصل الاول: استعراض المراجع	6-3
.4	الفصل الثاني: المواد وطرق العمل	11-7
.5	الفصل الثالث: النتائج والمناقشة	17-12
.6	الاستنتاجات والتوصيات	18
.7	المصادر	19

الخلاصة

اجريت هذه الدراسة من الفترة (2018/10/1) ولغاية (2019/2/15) وتضمنت جمع 100 عينة توزعت بين 75 عينة سريرية و 25 عينة بيئية .

جمعت العينات السريرية من المرضى الراقدين والمراجعين الى مستشفى القاسم في محافظة بابل وتضمنت هذه العينات (الإدرار ،الدم ، القشع ، مسحات الجروح والحروق ، مسحات الأذن). في حين تضمنت العينات البيئية (مياه اسالة (حنفية)، مياه الانهار). اوضحت نتائج الزرع البكتيري والفحص المظهري والمجهري والاختبارات الكيموحيوية ان 13 عزلة فقط تعود لبكتريا *Klebsiella* spp. تم اختبار حساسية هذه العزلات تجاه (11) نوع من المضادات الحيوية اعتمادا على طريقة الانتشار حول الاقراص. اظهرت النتائج ان جميع عزلات بكتريا *Klebsiella* spp. السريرية والبيئية امتلكت مقاومة متعددة للمضادات الحيوية المستخدمة، اذ ابدت مقاومة بنسبة 100% للاموكسيلين Amoxicillin والامبيسلين Ampicillin والريفامبيسين Rifampicin. في حين اظهرت حساسية عالية بنسبة 100% تجاه كل الامبينيم Imipenem والكلورامفينيكول Chloramphinol ، وتباينت حساسية العزلات لبقية المضادات الحيوية. كما بينت الدراسة ان عزلات بكتريا *Klebsiella* spp. السريرية هي اكثر مقاومة للمضادات الحيوية من عزلات بكتريا *Klebsiella* spp. المعزولة من العينات البيئية.

المقدمة

تعد بكتريا الكليبسلا *Klebsiella* من العصيات السالبة لصبغة غرام تنتمي الى العائلة المعوية Enterobacteriaceae، واسعة الانتشار بالطبيعة، فهي تمتلك نوعين من المواطن الشائعة الاول بيئي إذ تنتشر في مختلف البيئات خاصة المياه السطحية ، والموطن الآخر هو السطوح المخاطية للبائن. وفي هذا الصدد، تشبه بكتريا الكلبسيلا بكتريا *Enterobacter* و *Citrobacter* ولكن على عكس *Shigella* spp أو *E. coli* ، والتي تكون شائعة في البشر ولكن ليس في البيئة.

عرفت بكتريا *Klebsiella* بإنها مسبب شائع للالتهابات الرئوية، وسميت بهذا الاسم نسبة الى العالم الالماني Edwan Klebs الذي كان اول من عزلها في عام 1834، ثم شخصت هذه البكتريا لأول مرة من قبل العالم Friedlander عام 1882 ومنها جاءت تسميتها بعصيات فريدلاندر Bacilli Friedlander (Ko *et al.*, 2002).

تمثل بكتريا *Klebsiella* أحد أنواع الممرضات الأنتهازية Opportunistic Pathogens ، حيث ترافق هذه البكتريا المرضى الذين يعانون من ضعف مناعي Immunocompromised Patients ومرضى الانسدادات الرئوية ومرضى الإيدز، كما تسبب العديد من الاخماج المكتسبة من المستشفيات Nosocomial Infection مثل ذات الرئة و التهاب الجهاز البولي و انتان الدم وغيرها (Podschun and Ullman,1998).

تزداد الاصابة ببكتريا *Klebsiella* بسبب مقاومتها للمضادات الحيوية، اذ تمتلك هذه البكتريا اليات دفاعية ضد العديد من المضادات المستخدمة ومن هنا اكتسبت اهميتها كعامل ممرض للإنسان، كما ان سبب المقاومة يعود لزيادة استعمال المضادات وتكرارها مما ادى لظهور سلالات مطفرة امتازت بمقاومتها العالية لهذا المضادات. على هذا الاساس جاءت الدراسة الحالية للتعرف بشكل اولي على انتشار بكتريا الكليبسلا في البيئات المائية والسريرية ومقارنة حساسية هذه العزلات للمضادات الحيوية.

الـــفـــصـــل الاول

استعـراض المراجـــع

استعراض المراجع

وصف بكتريا *Klebsiella*

يحتوي جنس الـ *Klebsiella* *على* أنواع بكتيرية سالبة لصبغة غرام، على شكل عصيات قصيرة تنتمي الى العائلة المعوية، ، تتواجد على هيئة أزواج أو سلاسل قصيرة، يتراوح عرضها بين (0.3-1) مايكروميتر أما طولها يتراوح بين (0.6-6) مايكروميتر ، وهي بكتريا غير متحركة لا هوائية اختيارية درجة الحرارة المثلى لها هي (37)° م . بصورة عامة فأن هذه البكتريا تخمر سكر اللاكتوز lactose ، وقادرة على استهلاك السترات كمصدر وحيد للكاربون وتنتج انزيم اليوريز Urease وانزيم Lysin decarboxylase لكنها غير منتجة لانزيم Ornithine decarboxylase ، سالبة لفحص الاوكسديز oxidase وفحص الاندول وفحص احمر المثيل وموجبة لفحص الكاتليز Catalase ولفحص فوكس . بروسكاور- Voges Proskauer ، كما ان أنواع هذه البكتريا تمتلك القابلية على تثبيت النتروجين (Holt *et al* .,1994) .

من الصفات المميزة لهذه البكتريا امتلاكها محفظة Capsule مخاطية كبيرة لهذا فهي تكون مستعمرات لزجة، كما لها القدرة على تحرير كميات كبيرة من المادة المخاطية الهلامية على سطح وسط الماكونكي المزروع بها وهو ما يميزها عن بقية افراد العائلة المعوية، خاصة بعد استمرار الحضن لاكثر من 24 ساعة، كما يمكن مشاهدة خيط المخاط عند لمس المستعمرة بالعروة السلكية وسحبها (Levinson, 2004). ويحتوي جنس الكليبسلا على نوعين من المستضدات على سطحه وهو المستضد الجسمي (متعدد السكريد الشحمي)، والمستضد المحفظي مما يساهم في تنوع الانواع المصلية لبكتريا الكليبسلا

تعيش بكتريا *Klebsiella* بصورة رمية في البلعوم الانفي والقناة المعوية للانسان، وتختلف نسبة حاملي هذه البكتريا من دراسة الى اخرى ، إذ تتراوح نسبة عزلها من عينات البراز 5-38% بينما تتراوح نسبة عزلها من البلعوم الانفي بين 1-60% ، ولان البكتريا السالبة لملون غرام لا تجد الظروف الملائمة للنمو على جلد الإنسان لذا فان أنواع بكتريا *Klebsiella* تتواجد بصورة نادرة هناك، وبالتالي فهي تعد من الفلورا الطبيعية العابرة Transient الموجودة على جسم الإنسان (Podschun and Ullman,1998) .

أمراضية بكتريا *Klebsiella*

تعد بكتريا *Klebsiella* من الممرضات الأنتهازيه بسبب امتلاكها محفظة مقاومة للبلعمة Antiphagocytic Capsule، وهي مسؤولة عن المضاعفات الحاصلة بالاخماج الحادة مثل أنتان الدم وذات الرئة وأخماج السبيل البولي وأخماج الأنسجة الرخوة . وتشكل هذه البكتريا نسبة 7 % من الإصابات المكتسبة من المستشفيات، وترافق المرضى من كبار السن الذين يعانون من كبح مناعي Immunocompromised والمدمنين على الكحول ومرضى السكري ومرضى العجز الرئوي المزمن (Ko *etal*., 2002).

تعزل هذه البكتريا بنسبة 6-17 % من أخماج الجهاز البولي في المرضى الراقدين في المستشفيات وتأتي بنسبة 15 % في المرضى الخارجيين. وتزداد إصابات الجهاز البولي عند المرضى المستخدمين للقسطرة خصوصا بعد العمليات الجراحية، ويؤدي الاصابة بهذا النوع من البكتريا إلى تكون الحصى نتيجة انتاجها لانزيم اليوريز الذي يحول اليوريا إلى امونيا جاعلا الإدرار قلويا، كما يشجع على تكوين أملاح المغنيسيوم والكالسيوم المكونة للحصى (Berezin,1995). لا يوجد لقاح متوفر ضد هذه البكتريا لذلك ينصح بضرورة إزالة القسطرات البولية والداخل وريديه من المرضى بأسرع وقت لمنع تطور الاصابه بهذه البكتريا (Levinson , 2004) .

تتميز الاخماج الرئوية الناتجة عن هذه البكتريا بالمضاعفات السريرية وتكوين خراجات الرئة التي تحتاج إلى وقت كبير للمعالجة بالمضادات الحيوية، اضافة الى مشكلة ارتفاع مقاومة المضادات المتعددة بين عزلات المستشفيات (Meyer *etal* .,1993).

تسبب أخماج المستشفيات المتسببة عن بكتريا *Klebsiella* متاعب كثيرة عند الخدج ومرضى وحدات العناية المركزة (Gotoff ,1992) ، اذ لهذه البكتريا القدرة على إحداث الإصابة في الأغشية السحائية لدى الأطفال حديثي الولادة Neonatal Meningitis (Smith *etal* .,1990). فضلا على ذلك تسبب هذه البكتريا خراجات الكبد إلحاده Liver abscesses خاصة لدى مرضى السكري والتي تعد ضمن الإصابات المكتسبة في المستشفيات.

مقاومة بكتريا *Klebsiella* للمضادات الحيوية

باتت اهمية المضادات الحياتية واضحة في علاج مختلف الاصابات البكتيرية ابتداءً من الالتهابات البسيطة وصولاً الى علاج حالات انتان الدم. وقد رافق الاستخدام المتزايد الخاطئ لاغلب المضادات ظهور سلالات امتازت بمقاومتها العالية التي امتدت لتشمل مجموعة كبيرة من المضادات.

تعد بكتريا *Klebsiella* من الانواع البكترية المقاومة للمضادات الحياتية اذ لوحظ ان هذا الجنس امتلك اليات دفاعية ضد العديد من المضادات الحياتية المستخدمة مما ادى الى زيادة عزله من بيئات المستشفيات وزيادة انتشاره في البيئات المختلفة مما يجعل عملية القضاء عليه عملية صعبة للغاية ومن هنا اكتسب اهميته كعامل ممرض للانسان.

تعد مجموعة البيتا لاكتام β-lactam من المضادات الحياتية الاكثر اهمية من بين المجاميع الدوائية المضادة للبكتريا واكثرها استعمالاً. تكمن فعالية هذه المجموعة من المضادات الحياتية من خلال منع تصنيع جدار الخلية و التي بدورها تؤثر على نمو البكتريا. وتبدي بكتريا *Klebsiella* مقاومة تجاه مضادات البيتالاكتام. وتحصل ميكانيكية هذه المقاومة نتيجة لعوامل عدة أهمها أنتاج انزيمات التحلل المائي لحلقة البيتالاكتام β-lactam-hydrolyzing محولة بذلك المضاد إلى صوره غير فاعله قبل وصوله الهدف من خلال تحليل المضاد مائيا أو إضافة مجاميع له أو عن طريق الارتباط به ومنعه من الوصول للهدف (Neu,1991) .

تكمن فعالية المضادات الحيوية من مجموعة الكلايكوسيدات الامينية الى ايقاف تكوين البروتين و ايقاف تضاعف الخلية البكتيرية، ان هذه المضادات تستخدم بشكل واسع في علاج البكتريا السالبة لملون غرام. وأن أحدى وسائل مقاومة مضادات الأمينوكلايكوسيديه هي حصول تغيير في الو حده الرايبوسوميه 30 S والتي يرتبط بها المضاد ويؤدي ذلك التغيير الى تقليل ألفة المضاد لها. أو قد تحدث طفرات تغير من شكل البروتينات المسامية Porins في الغشاء الخارجي للبكتريا أو تؤدي إلى فقدانها مما لا يسمح بدخول المضادات الحيوية إلى داخل الخلية فتتحول من حساسة إلى مقاومه (Martinez-Martinez *et al* .,1999)

ان الاليات الرئيسية لمقاومة البكتريا للمضادات الحيوية بحسب ما ذكره Brook وجماعته 1998 هي:

1- انتاج انزيمات لها القابلية على تحطيم المضادات الحيوية مثل انزيمات البيتالاكتاميز.

2- تغيير نفاذية الغشاء الخلوي لمنع دخول المضاد الحيوي الى منطقة الهدف.

3- تغيير او تحوير جزيئة الهدف التي يعمل عليها المضاد الحيوي.

4- تغيير المسارات الايضية مما يؤدي الى تفادي التفاعل الذي يثبط المضاد الحيوي.

5- تطوير انزيمات بديلة لها القابلية على اداء الوظيفة الطبيعية للانزيم لكنها اقل تاثرا للمضاد الحيوي.

الفصـل الثــاني

المــواد وطــرق العــمل

المواد وطرق العمل

1- المواد :

ا- **الاجهزة والادوات:** استخدمت الاجهزة والادوات الواردة في الجدول ادناه:

جدول (1) الأجهزة والأدوات المستعملة في الدراسة

ت	اسم الجهاز
1	فرن كهربائي Oven
2	مجهر ضوئي مركب Compound Light Microscope
3	جهاز طرد مركزي Centrifuge
4	حاضنة Incubator
5	ميزان حساس Sensitive Balance
6	حمام مائي Water Bath
7	الموصدة Autoclave
8	الثلاجة Refrigerator
9	أنابيب بلاستيكية Plane Tubes
10	أطباق بتري بلاستيكية Petri Dishes Plates
11	مرشحات غشائية Millipore Filters 0.45,0.22
12	شرائح زجاجية نظيفةSlides
13	جهاز قياس الأُس الهيدروجيني pH-Meter
14	ماصات زجاجية مختلفة الأحجام Pipettes
15	سرنجات معقمة مختلفة الأحجامDisposable Syringe
16	جهاز تقطيرDistillator
17	مصباح بنزن Benzene Burner
18	عروة ناقلة Loop
19	مرشحات غشائية ذات ثقوب بقطر 0.22 و 0.45 مايكروميتر (0.22,0.45mm)Millipore filters

2- الاوساط الزرعية:

حضرت الأوساط الزرعية المستخدمة على وفق تعليمات الشركة المصنعة والمثبتة على العبوات وضبط الرقم الهيدروجيني وعقمت الأوساط الزرعية بالموصدة Autoclave بدرجة حرارة 121 ْم وضغط 15 باوند /أنج2 ولمدة 15 دقيقة وفق ماجاء في MacFaddin (2000).

جدول (2) الاوساط الزرعية المستخدمة في الدراسة

اسم الوسط الزرعي	الغرض من استعماله
MacConkey`s Agar أغار الماكونكي	أستعمل للتفريق بين البكتريا المخمرة وغير المخمرة لسكر اللاكتوز
Blood Agar Base أغار الدم	أستعمل للتحري عن قابلية البكتريا على تحليل الدم، اضيف الية الدم بعد ما برد الوسط الى الى درجة حرارة 50 م° بنسبة 5%
Agar Nutrient الاغار المغذي	استعمل هذا الوسط لغرض تنمية وتنقية العزلات البكتيرية
Muller-Hinton Agar أغار مولر هنتون	استعمل لغرض إجراء فحص الحساسية الدوائية
Simmon's Citrate Agar أغار سيمون سترات	استعمل لمعرفة قدرة البكتريا على استهلاك السترات كمصدر وحيد للكاربون.
Kligler's Iron Agar اغار كلكلر والحديد	استعمل هذا الوسط لمعرفة قابلية البكتريا على تخمير السكريات وانتاج غاز H_2S.
Peptone Water ماء الببتون	استعمل لغرض الكشف عن انتاج جذر الاند.ول
Methyl Red- Vogus Proskaur Media وسط احمر المثل – فوكس بروسكور	استعمل لغرض الكشف عن التحلل الكلي والجزئي لسكر الكلوكوز.
Nutrient Broth المرق المغذي	استعمل لغرض تنمية وتنشيط البكتريا وتحضير العوالق البكتيرية المختلفة
Urea agar bas وسط اغار اليوريا	استعمل لغرض اختبار قابلية البكتريا على انتاج انزيم اليوريز، اضيف اليه بعد ما برد الى درجة 50 م° اليوريا المعقم بالترشيح بنسبة 20%.

3-الكواشف والصبغات: حضرت الكواشف والمحاليل والصبغات المستخدمة في هذه الدراسة وفق ماجاء في MacFaddin (2000) .

جدول (3) الكواشف والصبغات المستخدمة في الدراسة

اسم الكاشف	الغرض من الاستخدام
كاشف الكاتليز Catalase reagent	استعمل هذا الكاشف للتحري عن قابلية البكتريا على انتاج انزيم الكاتاليز
كاشف الاوكسيديز Oxidase reagent	استعمل هذا الكاشف للتحري عن قدرة البكتريا على إنتاج إنزيم الاوكسيديز.
كاشف فوكس بروسكاور Voges-Proskauer reagent	استعمل هذا الكاشف للتحري عن قدرة البكتريا على التحليل الجزئي للسكريات.
كاشف المثيل الأحمر Methyl red reagent	استعمل هذا الكاشف للكشف عن قدرة البكتريا على إنتاج حامض كناتج نهائي للتحلل الكامل للسكريات
كاشف كوفاكس Kovac's reagent	استعمل هذا الكاشف للتحري عن قدرة البكتريا على إنتاج جذر الاندول
صبغة غرام Gram stain	استعملت لدراسة الخصائص المظهرية لخلايا البكتريا المعزوله تحت القوة الكبرى للمجهر الضوئي المركب.
محلول ماكفرلاند lacfrland solution	استعمل هذا المحلول لإعطاء عدد تقريبي للخلايا البكتيرية ($1.5*10^{8}$ خلية/مل) عند إجراء فحص الحساسية للمضادات الحيوية.

2- طرائق العمل:

1- **جمع العينات:** تم جمع 100 عينة وبواقع 75 عينة سريرية للمرضى الراقدين والمراجعين الى مستشفى القاسم في محافظة بابل و 25 عينة بيئية توزعت بين عينات مياه اسالة وماء انهار ومن المدة 1-10 2018 لغاية 15-2-2019 . وقد جمعت العينات السريرية (الإدرار ،الدم ، القشع ، مسحات الجروح والحروق ، مسحات الأذن) باستخدام انابيب ومسحات معقمة بمساعدة كادر مختبر الاحياء المجهرية في المستشفى ، اما عينات الماء البيئية فقد جمعت باستخدام انابيب بلاستيكية معقمة ونقلت خلال ساعة الى مختبر الاحياء المجهرية في المستشفى لغرض زراعتها.

2- **زرع العينات:** زرعت العينات على وسط اكار الماكونكي ثم حضنت بحرارة (37)° م لمدة (24) ساعة للحصول على المستعمرات ثم نقلت وتمَّ تنقيتها إلى مستعمرات منفردة ليتم تشخيصها حسب الطرائق المعتمدة من قبل(1994) .Holt et al .

3-التشخيص المختبري:

_التشخيص المظهري حسب الصفات الزرعية: اعتمد التشخيص الاولي على الصفات الزرعية للمستعمرات النامية على وسط أكار الماكونكي والتي أعطت مستعمرات مخاطية ومخمرة لسكر اللاكتوز الموجود في هذا الوسط .

-**التشخيص المجهري باستخدام صبغة غرام :** اخذت مسحة من مستعمرة بكتيرية منفردة بوساطة الناقل المعقم ووضعت على شريحة زجاجية نظيفة وثبتت المسحة وصبغت بصبغة غرام وبعد جفاف الشريحة فحصت مجهريا لملاحظة طبيعة تصبيغ الخلايا البكتيرية وشكلها وتجمعاتها .

-**فحص اختبار الحركة :** تم الاعتماد على طريقة القطرة المعلقة، حيث استعملت شريحة زجاجية خاصة تحوي في مركزها على تقعر، نقل ملئ ناقل من مزرعة سائلة بعمر (18 – 24) ساعة على غطاء الشريحة وقلبت على التقعر بحذر شديد لعدم ملامسة القطرة سطح التقعر لتبقى معلقة ولوحظ حركة البكتريا من عدمها بفحص الشريحة على العدسة الزيتية للمجهر.

-الاختبارات الكيميائية الحيوية Biochemical Tests:

فحص الاندول: لقحت الأنابيب الحاوية على ماء الببتون بالمستعمرات البكتيرية النقية وبعد الحضانة لمدة 24 ساعة وبدرجة 37 °م ، تم إضافة قطرات من كاشف كوفاكس للتحري عن قابلية البكتريا على انتاج الاندول . إن تكون حلقة حمراء من الاندوفينول دليل على النتيجة الموجبة أما إذا تكونت حلقة خضراء دليل على النتيجة السالبة.

فحص احمر المثيل: لقحت الأنابيب الحاوية على وسط MR-VP بالمستعمرات البكتيرية النقية، حضنت لمدة 24 ساعة ودرجة 37 °م . بعد ذلك اضيفت قطرات من كاشف المثيل الاحمر . إن تحول الوسط إلى اللون الأحمر دليل على ايجابية الفحص.

فحص فوكس بروسكور: لقحت الأنابيب الحاوية على وسط MR-VP بالمستعمرات البكتيرية النقية ، وبعد الحضانة لمدة 24 ساعة وبدرجة 37 °م اضيفت قطرات من كاشف فوكس بروسكاور، إن تحول الوسط إلى اللون الأحمر دليل على ايجابية الفحص.

القابلية على استهلاك السترات: لقحت الأنابيب الحاوية على وسط سيمون ستريت بطريقة الطعن والتخطيط على السطح المائل بالعزلة البكتيرية وحضنت لمدة 24 ساعة وبدرجة 37 °م . عند تغير لون الوسط من الأخضر إلى الأزرق دليل على قدرة البكتريا على استهلاك السترات كمصدر وحيد للكربون . أما عند احتفاظ الوسط بلون الكاشف الأخضر فان النتيجة تكون سالبة.

اختبار تخمر السكريات وانتاج الغاز: لقحت الأنابيب الحاوية على وسط Kligler`s-iron agar بطريقة الطعن والتخطيط بالمستعمرات البكتيرية على السطح المائل والحضانة لمدة 24 ساعة بدرجة 37 °م . لوحظت التغيرات الحاصلة في القعر والسطح المائل ولوحظ التخمر بتغير لون الكاشف من الأحمر الى الأصفر دليل على قدرة البكتريا على تخمر سكري اللاكتوز والكلوكوز . وملاحظة تكون الغاز على شكل فقاعات أسفل الوسط.

اختبار الاوكسيديز: نقلت مستعمرات قليلة من النمو البكتيري المزروع على الوسط المغذي الصلب بعمر 18-24 ساعة بوساطة أعواد خشبية إلى ورقة الترشيح ، ووضع فوق المستعمرة بضع قطرات من كاشف الاوكسيديز. إن ظهور اللون البنفسجي بعد مرور 2-10 ثوان يدل على النتيجة الموجبة.

اختبار الكاتليز: نقلت مستعمرات قليلة من النمو البكتيري المزروع على الوسط المغذي الصلب بعمر 18-24 بوساطة أعواد خشبية إلى سطح شريحة زجاجية نظيفة وجافة ووضع فوقها قطرة كاشف الكاتليز . وإن ظهور فقاعات هوائية على سطح الشريحة دليل على أن النتيجة موجبة.

4-اختبار الحساسية للمضادات الحيوية: اختبرت حساسية العزلات البكتيرية لـ (11) نوع من المضادات الحيوية على وفق طريقة (1966) .Baure et al ، حيث زرعت العزلات البكتيرية التي تم الحصول عليها على الوسط المغذي السائل Nutrient broth وحضنت بحرارة (37)° م لمدة (18) ساعة ، ثم ضبط تخفيف كل عزلة اعتمادا على محلول ماكفرلاند القياسي ، بعدها نقل (1) مل من المزروع ونشر على وسط Muller Hinton Agar بالتساوي ، بعدها وضعت أقراص المضادات الحيوية بواقع اربع اقراص لكل طبق على سطح الوسط بوساطة ملقط معقم باللهب. حضنت الأطباق بدرجة حرارة (37) 0 م لمدة (24) ساعة ، ثم قرأت النتائج بقياس أقطار التثبيط حول كل قرص وقورنت مع أقطار التثبيط القياسية.

الفصل الثالث

النتائج والمناقشة

النتائج والمناقشة

عزل وتشخيص بكتريا *Klebsiella*

الصفات الزرعية : أظهرت نتائج الفحص الزرعي أن هناك 13 عزلة من مجموع العينات البالغ (100) عينة أعطت صفات مستعمرات بكتريا *Klebsiella* spp. حيث استطاعت النمو على وسط الماكونكي وخمرت سكر اللاكتوز فيه وكونت مستعمرات ورديه براقة ذات قوام مخاطي وهي صفة مميزة لهذه البكتريا ، اما على وسط أكار الدم فكانت مستعمراتها شفافة لماعة غير قادرة على تحلل الدم (Levinson et al ..,2004)

الفحص المجهري: أوضحت نتائج الفحص ألمجهري باستخدام التصبيغ بصبغة غرام أنها عصيات قصيرة سالبة لملون غرام اتخذت هيئة مفردة أو مزدوجة أو بشكل سلاسل قصيرة (Holt et al., 1994) .

اختبار الحركة: لوحظ عدم قابلية العزلات البكتيرية على الحركة عند فحصها بطريقة القطرة المعلقة، ويعد هذا الاختبار ذا أهمية لتفريق بكتريا *Klebsiella* spp. عن بكتريا *Enterobacter* spp. المتحركة والتي تعطي في أغلب الأحيان صفات زرعية مشابهة لبكتريا *Klebsiella* (MacFaddin, 2000) .

التشخيص الكيميائي الحيوي: يشير الجدول (4) إلى نتائج الفحوصات الكيميائية الحيوية التي اعتمدت لتشخيص بكتريا *Klebsiella* spp. وكانت مطابقة للصفات التشخيصية العالمية لبكتريا *Klebsiella* وحسب توصيف (Holt et al., 1994) . اذ اعطت العزلات البكتيرية نتيجة سالبة لفحص الاندول والمثيل الاحمر والاوكسيديز بينما كانت العزلات البكتيرية منتجة لانزيم الكاتليز وانزيم اليوريز واعطت كشفا موجبا لفحص الفوكس بروسكاور واستهلاك السترات، ولم تنتج غاز H2S.

جدول (4) الصفات الكيمياوية الحيوية لبكتريا *Klebsiella*

الاختبار	النتيجة
انتاج الاندول	–
احمر المثيل	–
فوكس بروسكاور	+
استهلاك السترات	+
انتاج اليوريز	+
الاوكسديز	–
الكاتليز	+
السكريات الثلاثية والحديد	Gas no H2S

أعداد ونسب بكتريا *Klebsiella* المتواجدة في العينات السريرية والبيئية:

تم عزل وتشخيص (13) عزلة عائدة لبكتريا *Klebsiella* spp. من مجموع 100 عينة سريرية وبيئية، توزعت على 11 عزلة بنسبة (15%) من مجموع (75) عينة مأخوذة من المرضى المراجعين والراقدين في مستشفى القاسم، تضمنت (7) عزلات من مجموع (40) عينة ادرار، وعزلتين من بكتريا *Klebsiella* من اصابات الاذن، وعزلة واحدة من اصابات الجروح والحروق، وعزلة واحدة ايضا من عينات القشع . في حين لم نحصل على أي عزلة من اصابات الدم. اختلفت نسبة عزل بكتريا *Klebsiella* عن الدراسات السابقة (حمدي ونجيب، 2016) وذلك يعود الى عدد من الاسباب منها اختلاف عدد العينات واختلاف مكان جمع العينات، اضافة الى اختلاف الظروف الصحية والبيئية التي يعيشها المرضى، كما توضح الدراسة الحالية الى انتشار هذه البكتريا في بيئة المستشفيات وذلك يعود الى مقاومتها للمضادات الحياتية .

اما العزلات البيئية شكلت نسبة (8%) وتضمنت عزلتين فقط من مياه الانهار بنسبة (20%) وهذا يشير إلى تكيف هذه البكتريا للبيئات المائية كذلك فأن المياه النهرية تعد المستقبل الرئيسي للملوثات نتيجة تدفق مياه المجاري وفضلات المناطق الحضرية إلى هذه الأنهار. في حين لم نحصل على اي عزلة من

مياه الاسالة وهذا يعود إلى أن استخدام الكلور في عمليات التعقيم يقضي على عدد كبير من الأحياء المجهرية ومنها بكتريا الكليبسلا.

جدول (5) اعداد ونسب بكتريا المعزولة من عينات سريرية وبيئية

نوع العينة	عدد العينات	عدد عزلات بكتريا *Klebsiella*	النسبة المئوية
ادرار	40	7	%18
جروح وحروق	10	1	%10
قشع	10	1	%10
مسحات اذن	10	2	%20
دم	5	0	0
المجموع	**75**	**11**	**%15**
ماء اسالة	15	0	%0
ماء انهار	10	2	%20
المجموع	**25**	**2**	**%8**

مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية

اختبرت حساسية عزلات بكتريا *Klebsiella* تجاه (11) نوع من المضادات الحيوية شائعة الاستخدام في المؤسسات الصحية في علاج مختلف الاخماج التي يتعرض لها الإنسان. وأظهرت النتائج التي تم الحصول عليها ان جميع العزلات المرضية والبيئية أعطت مقاومة بنسبة (100%) للاموكسيلين والامبيسيلين والريفامبيسين لذلك فان جميع العزلات قد امتلكت مقاومة متعددة للمضادات الحيوية المستخدمة.

كما أظهرت النتائج ان أكثر المضادات الحيوية المستخدمة فاعلية هي الامبينيم والكلورامفنيكول، اذ اظهرت جميع العزلات حساسية بنسبة 100% لهذين المضادين وقد يعود السبب الى قلة شيوع استخدام مضاد الكلورومفينيكول مقارنة مع المضادات الأخرى، اضافة الى إلى فعالية وقابلية مضاد الامبينيم على اختراق الأغشية البكتيرية بالإضافة إلى ثباتها العالي تجاه معظم إنزيمات البيتالاكتاميز. كما اظهرت العزلات حساسية عالية للسبروفلوكساسين اذ بلغت المقاومة نسبة 7.6 % ، ويعد من أهم مضادات الكوينولونات Quinolones ذات الفاعلية ضد أخماج السبيل البولي وقد أشارت دراسة (Gur et al .,1999) أن عزلات البكتريا السالبة لملون غرام أظهرت نسبة مقاومة قليلة جدا تجاه هذا المضاد بلغت (3%) فقط.

شملت هذه الدراسة مضادين من مضادات الجيل الثالث للسيفالوسبورينات التي تعد من أكفأ المضادات فاعلية ضد أنواع بكتريا *Klebsiella* وهما سيفوتاكسيم Cefotaxim وسيفتازيديم Ceftazidime، بينت النتائج مقاومة العزلات بنسبة 38.4 % لمضاد Ceftazidime أما مضاد Cefotaxim فقد أعطى حساسية ضد العزلات المستخدمة وكانت نسبة المقاومة له 15.4. قد يعود ظهور عزلات مقاومة لهذه المضادات نتيجة للاستخدام الواسع والعشوائي لهذه المضادات وعدم مراعاة ظهور مثل هذه العزلات المقاومة والتي يشكل تزايدها خطورة للمرضى وتعود مقاومة هاذين المضادين لإنتاج انزيمات البيتالاكتام واسعة الطيف Extended Spectrum β- Lactamase ESBLs إذ تعمل هذه الانزيمات على تحطيم المضاد (Bonnet et al .,2015) .

أما مضادات الامينوكلايكوساید Amino glycoside فقد اختبرت الحساسية تجاه اميكاسين Amikacin وجينتامايسين Gentamycin ، وتبين من النتائج أن العزلات كانت حساسة للـ Amikacin أكثر من الجنتامايسين Gentamycin ، حيث بلغت نسبة المقاومة للميكاسين 15.4 % بينما اظهرت اربع عزلات مقاومة للجنتامايسين بنسبة 30.8 % . تنتج المقاومة لهذه المضادات أما بسبب إفراز

البكتريا لبعض الانزيمات التي تعمل على تحوير المضاد مما يؤدي الى تقليل فاعلية المضاد أو قد يعود ظهور المقاومة الى فقدان بعض من بروتينات الغشاء الخارجي ما يقلل من نفاذية المضاد ودخوله إلى الخلية (Laurence et al.,1997) . أما مضاد Trimethoprim فقد كانت العزلات مقاومة له بنسبة 46.2%.

ان المقاومة للمضادات الحيوية لا تظهرها البكتريا الممرضة فقط بل وحتى البكتريا غير الممرضة والبكتريا المعزولة من عينات بيئية، بسبب وجود البلازميدات التي تحمل صفة المقاومة للمضادات الحيوية، زيادة على امكانية انتقالها من خلية الى اخرى، او قد تنشا المقاومة عن طريق الجينات القافزة. كما نلاحظ ان العزلات الممرضة اكثر مقاومة للمضادات الحيوية من العزلات البيئية.

جدول (6) : مقاومة عزلات بكتريا *Klebsiella* للمضادات الحيوية .

المضادات الحيوية	مصدر العزلات المقاومة وعددها							مجموع العزلات المقاومة ونسبتها
	الادرار	جروح وحروق	قشع	مسحات اذن	دم	ماء اسالة	ماء انهار	
Ampicillin	7	1	1	2	0	0	2	**(100)13**
Amoxicillin	7	1	1	2	0	0	2	**(100)13**
Rifampicin	7	1	1	2	0	0	2	**(100)13**
Trimethoprim	4	1	0	1	0	0	1	**(46.2)6**
Ceftazidime	3	0	0	1	0	0	1	**(38.4)5**
Gentamycin	2	0	0	1	0	0	1	**(30.8) 4**
Amikacin	2	0	0	0	0	0	0	**(15.4)2**
Cefotaxim	2	0	0	0	0	0	0	**(15.4) 2**
Ciprofloxacin	1	0	0	0	0	0	0	**(7.6) 1**
Chloramphinicol	0	0	0	0	0	0	0	**0**
Imipenem	0	0	0	0	0	0	0	**0**
المجموع الكلي للعزلات	7	1	1	2	0	0	2	**13**

الاستنتاجات والتوصيات

الاستنتاجات والتوصيات

الاستنتاجات

-عزل بكتريا *Klebsiella* spp بنسبة 15% من العينات السريرية ونسبة 8% من العينات البيئية.

-أظهرت عزلات بكتريا *Klebsiella* spp مقاومة لأغلب المضادات الحيوية فضلا عن إن جميع عزلاتها اظهرت مقاومة متعددة للمضادات الحيوية.

-عزلات بكتريا *Klebsiella* spp السريرية اكثر مقاومة للمضادات من العزلات البيئية.

التوصيات

- عزل بكتريا *Klebsiella* spp من مصادر بيئية مختلفة ودراسة حساسيتها للمضادات الحيوية.
- التوعية والتثقيف للحد من الاستعمال العشوائي والمتكرر للمضادات الحيوية.

المصادر

المصادر

- حمدي، نغم معد؛ نجيب، ليث مصلح: 2016. عزل وتشخيص بكتريا الكليبسيلا من مواقع بيئية بيئية مختلفة ودارسة مقارنة لحساسية *Klebsiella spp* العزلات تجاه بعض مضادات الحيوية. مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة، المجلد العاشر، العدد الاول.

1. Podschun , R. and Ullmann ,U.(1998). *Klebsiella* spp. As Nosocomial pathogens : Epidemiology, Taxonomy , Typing methods and pathogenicity factors , Clin. Microbiol. Rev. 11(4):589-603.
2. Ko, W. C. ; Paterson , D. L. ; Sagnimeni, A. J. ; Hansen , D. S. ; Gottberg, A. V. ; Mohapatra, S. ; Casllas. J. M. ; Gossens, H. ; Mulazimoglu, L.; Trenholme , G.; Klugman , K. P.; McCrmack, J. G. and Yu, V. L. (2002). Community- Acquired *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia: Global differences in clinical patterns. Emerg. Infect. Dis. 8(2):160-166.
3. Levinson, W. (2004). *Klebsiella* in : Medical Microbiology & Immunology examination & Broad review 8th ed. The McGrow-Hill Companies Appleton &Lange Int. Ed. U.S. A.
4. Berezin ,B.(1995). Nosocomial infections : New agents ,incidence ,Prevention .Press- Med .24(2):89 -97.
5. Meyer,K.S.; Urban, C.; Eagan, J. A.; Berger, B.J. and Rahal, J.J. (1993). Nosocomial outbreak of *Klebsiella* infection resistant to late-generation cephalosporin , Ann. Inter. Med. 119:353-358.
6. Smith, C. ; Tillman, B. ; Howell, A.; Longfield, R. and Torgensen, J. (1990). Failure of Ceftazidim-Amikacine therapy for bacterimia and meningitis due to *Klebsiella pneumoniae* producing an extended-

spectrum ß-Lactamase , Antimicrob. Agen. Chemother. 34(6):1290-93.

7. Neu, H. C. (1991). Therapy and prophylaxis of bacterial infections P:437-493. in Harrison's principles of medicine by Wilson, J. D. ; Braunwolde, D.; Isselbacher, K. ;Martin, J. B.; Facui, A. S. and Root, R. 12th ed . VI.McGrew Hill. New York .

8. Martinez-Martinez, L.;Pascual, A.; Alles, S.H.; Diaz, D.; Suarez, A. I.; Tran, J. Benedi, V. J. and Jacoby, G. A. (1999). Roles of ß-Lactamases and Porins in activities of Carbapenemes and Cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae* , Antimicrob. Agen. Chemother. 43(7):1669-73.

9. Brooks ,G.F. ; Butel, J.S. and Morse ,S. A. (1998).*Klebsiella* in : Jawetz , Melenik and Adelberg's Medical Microbiology . 21st ed . Middle East ed . Beirut. Lebanan.

10. National Committee for clinical laboratory standards. (2013). Approved standard M2-A8. performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests , 11th ed. NCCLS, Wayne, Pa.

11. Holt, J.G..; Krieg, N.R..; Sneath, P.H.A.; Staley,J.T. and Williams, S. T.(1994).Bergey's manual of determinable bacteriology 9th ed . William and Wilkins, Baltimore.

12. Bauer,A.W.; Kirby,W.M.M.; Sherris,J.S. and Turk,M.(1966). Antibiotic Susceptibility testing by a standardized single disk method. Amer. J. Clin. pathol. 45 :493-496.

13. MacFaddin , J.F. (2000). Biochemical test for identification of medical bacteria , 3rd ed. The Willims and Wilkinson Baltimor. USA.

14. Gur, D. ; Kanra, G.; Ceyhan, M; Seemer, G. ; Kanra, B. and Kaymakoglu, L.(1999). Epidemiology and antibiotics resistance of Gram – negative urinary pathogens in pediatric patients . Turk. J. pedia. 41:37-42.

15. Bonnet,R.;Marchndin,H.;Chanal,D.Sirot,D.Labia,R.;DeChamps,C.;Jumas-Bilak,E.and Sirot,J.(2015). Chromosome-Encoded class D- ß-lactamase OXA-23 in *Proteus mirabilis* . Antimicrob. Agen. Chemother. 46(6):2004 -2006.

16. Laurance, D. R. ; Bennet, P. N. and Brown , M.J. (1997). Principle of antimicrobial chemotherapy , 8th ed . Churchill Livingston, P: 187-214.