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

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

(قَالُوا سُبْحَانَكَ لَا عِلْمَ لَنَا إِلَّا مَا
عَلَّمْتَنَا إِنَّكَ أَنْتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ)

صَدَقَ اللَّهُ العَظِيمْ

سورة البقرة: الآية (32)

الإهـــــــداء

الى والدي المرحوم الذي افنى حياته بالعطاء .. ووهن عظمه كرماً في تعليمي

الى والدتي التي ذبل رحيقها حباً في تربيتي

الى أخواني وأخواتي الاعزاء

الى زوجي الغالي

الى أولادي سامر، وتسنيم قرة عيني، وأملي، وفرحتي في الدنيا

إلى الذين بذلوا كل جهد وعطاء حتى اصل إلى هذه اللحظة

الى أساتذتي الكرام امتناناً وتقديرا.

أهدي لهم جميعاً ثمرة جهدي المتواضع

— الباحثة

الشـــكر والتقديـــــر

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على أشرف المرسلين سيدنا محمد وعلى آله وصحبه أجمعين .. وبعد

أود في بادئ الأمر أن أعرب عن شكري وتقديري وامتناني الى أستاذيَّ الفاضلين الأستاذ الدكتور عباس عبود فرحان الدليمي ، والأستاذ المساعد الدكتور هادي رحمن رشيد الطائي لما قدماه لي من عون وتوجيهات سديدة طوال فترة البحث ورفدهما لي بالمعلومات، فقد أعطوني نموذجاً رائداً يجمع بين سعة المعرفة وتواضع العلم والخلق الرفيع .

كما أتقدم بوافر شكري وتقديري الى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة ، ورئاسة قسم علوم الحياة لإتاحتهم الفرصة لإكمال دراستي العليا وما قدموه من عون ومساعدة .

أتوجه بالشكر والامتنان الى عمادة كلية العلوم / قسم علوم الحياة، ومنتسبي القسم، وأخص بالذكر منهم : م.عصام حامد حميد، وم.م لينا عبد الأمير سلمان ، وم.م أنسام داوود سلمان لما قدموه لي من دعم ومساعدة .

شكري وثنائي الى مدير مختبر الصحة العامة في بعقوبة البكتريولوجي السيد هادي علي حمودي ، ومنتسبي مختبر الصحة العامة كافة وأخص بالذكر منهم الدكتور داوود سلمان ، والبكتريولوجي رامي حميد ، والكيماوية فاتن مهدي غائب ، والكيماوية زينب هاشم .

كما أتقدم بجزيل الشكر والامتنان الى الدكتور مخلد نصيف سعود / مدير ردهة الحروق في مستشفى بعقوبة التعليمي ،وشكري وتقديري الى منتسبي مختبر الإحياء المجهرية في مستشفى بعقوبة التعليمي ، ومنهم السيدة ثريا كاظم ..

ولا يفوتني أن أشكر زميلاتي وزملائي طلبة الدراسات العليا .. داعية الله لهم بدوام النجاح والموفقية ..

وفي الختام لايسعني إلا أن أتقدم بوافر الشكر والتقدير الى أسرتي داعية من الباري عز وجل أن يمن عليهم بالصحة والعافية .. وألتمس أخيراً العذر ممن فاتني أن أشكرهم ، جزاهم الله عني كل خير .

الباحثة

إقرار المشرفين على الرسالة

نشهد بأن إعداد هذه الرسالة الموسومة بـ **(دراسة بكتريولوجية ووراثية لبكتريا *Klebsiella spp* المعزولة من إصابات مرضية مختلفة)** التي قدمتها طالبة الماجستير **(إيمان عباس علي نور الله الزنكنه)** قد جرى تحت إشرافنا في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / الأحياء المجهرية .

التوقيع :

المشرف : د. عباس عبود فرحان الدليمي

اللقب العلمي : أستاذ

كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى

التاريخ : / / 2012

التوقيع :

المشرف : د.هادي رحمن رشيد الطائي

اللقب العلمي : أستاذ مساعد

كلية العلوم / جامعة ديالى

التاريخ : / / 2012

توصية رئيس قسم علوم الحياة

بناءً على التوصيات المتوافرة نرشح هذه الرسالة للمناقشة

التوقيع :

الأسم : د. نجم عبدالله الزبيدي

اللقب العلمي : أستاذ مساعد

رئيس لجنة الدراسات العليا – رئيس قسم علوم الحياة

التاريخ : / / 2012

بسم الله الرحمن الرحيم

إقرار الخبير اللغوي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة بـ **(دراسة بكتريولوجية ووراثية لبكتريا *Klebsiella spp* المعزولة من إصابات مرضية مختلفة)** التي قدمتها طالبة الماجستير **(إيمان عباس علي نور الله الزنكنه)** قد تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وصُحّحَ ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير.

التوقيع

/ / 2012

بسم الله الرحمن الرحيم

إقرار المقوم العلمي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة بـ **(دراسة بكتريولوجية ووراثية لبكتريا *Klebsiella spp* المعزولة من إصابات مرضية مختلفة)** التي قدمتها طالبة الماجستير **(إيمان عباس علي نور الله الزنكنه)** قد تمت مراجعتها من الناحية العلمية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة .

التوقيع

/ / 2012

إقرار لجنة المناقشة

نشهد نحن أعضاء لجنة المناقشة ، أننا إطلعنا على هذه الرسالة الموسومة بـ **(دراسة بكتريولوجية ووراثية لبكتريا *Klebsiella spp* المعزولة من إصابات مرضية مختلفة)** التي قدمتها طالبة الماجستير **(إيمان عباس علي نور الله الزنكنه)** وقد ناقشنا الطالبة في محتوياتها وفيما له علاقة بها ونعتقد إنها جديرة بالقبول لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة / الأحياء المجهرية بدرجة( ) .

رئيس اللجنة

التوقيع :

الأسم :

المرتبة العلمية :

التاريخ : / / 2013

عضو اللجنة

التوقيع :

الأسم :

المرتبة العلمية :

التاريخ : / / 2013

عضو اللجنة

التوقيع :

الأسم :

المرتبة العلمية :

التاريخ : / / 2013

عضو اللجنة المشرف

التوقيع :

الأسم : د.عباس عبود فرحان الدليمي

المرتبة العلمية : أستاذ

التاريخ : / / 2013

عضو اللجنة المشرف

التوقيع :

الأسم : د.هادي رحمن رشيد الطائي

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

التاريخ : / / 2013

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة

التوقيع :

الأسم :

المرتبة العلمية :

التاريخ :

الخلاصـــة

تضمنت الدراسة جمع 206 عينة سريرية ، شملت 70 عينة جروح و 56 عينة حروق و 57 عينة قشع و23 عينة إدرار من مرضى يعانون من أخماج مختلفة من مستشفيات مدينة بعقوبة للفترة الواقعة من 2011/9/15 الى 2012/1/12 .

وجد ان نتائج الزرع البكتيري على أوساط أكار الماكونكي و اكار الدم و وسط Eosin methylene blue والتشخيص المظهري والفحوصات الكيموحيوية وتأكيد التشخيص بأستخدام نظامي VITEKA2،API20E أن 22 عزلة تعود لبكتريا *Klebsiella pneumonia* .

أوضحت نتائج التحري عن بعض عوامل الضراوة لبكتريا *Klebsiella pneumonia* ، إن العزلات جميعها محاطة بمحفظة، وغير قادرة على إنتاج أنزيم الهيمولايسين، بينما أظهرت جميع العزلات القابلية على إنتاج أنزيم اليوريز ، وإنتاج الغشاء الحيوي (Biofilm)، أما إنتاجية العزلات للبكتريوسين فقد بلغت نسبتها 40.9% .

وجد ان 19 عزلة (86.4%) قدرتها على إنتاج أنزيم البيتا لاكتاميز، كما لها القابلية على إنتاج أنزيمات البيتا لاكتاميز الواسعة الطيف بأستخدام طريقة الأقراص المتاخمة (Disc Approximation) اذ كانت 9 عزلات بنسبة (40.9%) ، كما تم أختبار قابليتها على إنتاج أنزيمات Metallo β-Lactamase وبأستخدام طريقة Imp-EDTA combination disc إذ استطاعت 12 عزلة (54.5%) إنتاج الأنزيم .

أن جميع العزلات نمط المقاومة المتعددة تجاه 16 مضاداً حيوياً وبنسبة 100% لمضادات الامبسيلين، والكاربنسيلين، والببراسيلين، في حين كانت معظم العزلات حساسة لمضادي الاميبينيم والكلورامفينيكول، وتفاوتت نسبة المقاومة لباقي المضادات . بينت النتائج أن هناك أختلافاً واضحاً في قيم M.I.C وأستطاعت أكثر العزلات مقاومة تراكيز عالية من الأمبسيلين والببراسيلين بتراكيز (1024 – 512) مكغم / مليليتر، بينما كانت العزلات حساسة لمضاد الاميبينيم بتراكيز (32 – 4) مكغم / مليليتر.

تم تحديد تحمل البكتريا لتراكيز مختلفة من المعادن الثقيلة وذلك بتنميتها على أوساط تحتوي على تراكيز مختلفة (3 ، 1.5 ، 0.03 ، 0.03 و 1.5) ملي مول من معادن (النحاس، والكوبلت، والزئبق، والفضة، والزنك) على التوالي حيث كان أعلى تركيز تحملته البكتريا لمعدن النحاس (3) ملي مول، وأقل تركيز تحملته كان لمعدني الزئبق والفضة (0.01) ملي مول.

بينت نتائج المحتوى البلازميدي للعزلات قيد الدراسة إحتواء معظم العزلات على حزمتين بلازميديتين مختلفتي الحجم ، وخلت بعض العزلات من اي حزم بلازميدية .

تم إجراء الأقتران البكتيري لمجموعة من العزلات التي أبدت مقاومة عالية للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة فضلاً عن إنتاجها لأنزيمات البيتا لاكتاميز مع السلالة القياسية *E.coliMM294* ولم تستطع العزلات تحقيق الأقتران في الوسط السائل أو في الوسط الصلب بطريقة Seldeen، بينما أستطاعت جميع العزلات الحاوية على بلازميدات والبالغة 18 عزلة تحقيق الأقتران بنسبة 100% على الوسط الصلب بطريقة Miller إذ أعتمدت على النمو الكثيف والتلامس المباشر بين السلالتين الواهبة والمستلمة .

تحري عن المحتوى البلازميدي للخلايا الأقترانية ووجد أن اغلب البلازميدات كانت قد أنتقلت من السلالة الواهبة المتمثلة بالعزلات قيد الدراسة الى السلالة القياسية وقد أستطاعت 15 عزلة إقترانية (83.3%) من 18 عزلة إقترانية من إنتاج أنزيم البيتا لاكتاميز، وأستطاعت 9 عزلات إقترانية (50%) من إنتاج أنزيمات البيتا لاكتاميز الواسعة الطيف، وتمكنت 10 عزلات إقترانية (55.6%) من إنتاج أنزيمات الميتالوبيتا لاكتاميز، فضلاً عن ذلك قد أنتقلت مقاومة مشتركة لاكثر من مضاد حيوي ومعدن ثقيل للخلايا الاقترانية مما يدل على ان هذه الصفات محمولة بلازميديا.

قائمة المختصرات الواردة في الرسالة

Abbreviation	Key
Api 20E	Analytical profile index 20 Enterobacteria
B-lactamase	Beta lactamase
DNA	Deoxy Ribo Nucleic acid
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Aciticacid
ESBL	Extended Spectrum Beta Lactamse
ICU	Intensive Care Unit
K.pneumoniae	Klebsiella pneumoniae
KPC	Klebsiella pneumoniae carbapenemases
LPS	Lipo Poly Saccharid
µg	Microgram
Mg	Miligram
M.I.C	Minimal Inhibitory Concentration
MLB	Metallo Beta Lactamase
NCCLs	National Committee for Clinical Lab rotary Standard
Omps	Outer membrane proteins
PBPs	Penicillin Binding Proteins
PCR	Polymerase Chain Reaction
Spss	Statistical package for social sings
TBE	Tris-Boric acid-EDTA
WHO	World Health Organization

قائمة المصطلحات المعربة الواردة في الرسالة

Antagonism	التضاد الميكروبي
Antibiotic	المضاد الحيوي
Antimicrobial agent	مواد ضد مايكروبية
Bacteremia	تجرثم الدم
Bactriocidal	قاتل
Bactriostatic	مثبط
Biofilm	الغشاء الحيوي
Chelating agent	عوامل كلابية
Detergents	منظفات
dialysis	ديلزة
Donation	هبة
Extracellular	خارج خلوي
Electrophoresis	ترحيل كهربائي
Standard deviation	الانحراف المعياري

قائمـــــة الجـــــداول

رقم الجدول	العنـــوان	الصفحة
1-3	الأختبارات الكيموحيوية بأستعمال نظام APi 20 E	52
2-3	الفحوصات الكيموحيوية التي يقوم بها جهاز VITEK2	54
3-4	يبين الأختبارات الكيموحيوية والزرعية والمجهرية لبكتريا *K.pneumoniae*	67
4-4	يبين عزلات بكتريا *K.pneumoniae* مشخصة بوساطة جهاز ViTEk2 وحسب الأختبارات المعتمدة في التشخيص	69
5-4	عدد العزلات ونسبها حسب مواقع الإصابة .	70
6-4	قابلية عزلات بكتريا *K.pneumoniae* على إنتاج البكتريوسين	74
7-4	التحليل الأحصائي لقابلية العزلات على إنتاج البكتريوسين	74
8-4	عوامل الضراوة الموجودة في العزلات قيد الدراسة	77
9-4	قابلية عزلات *K.pneumoniae* على إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميزالمعدنية .	81
10-4	التحليل الأحصائي لقابلية بكتريا *K.pneumoniae* على إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميزالمعدنية .	82
11-4	المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية التي أظهرتها عزلات *Klebsiella pneumonia*	88
12-4	تقسيم العزلات المحلية لبكتريا *Klebsiella pneumonia* الى مجموعتبن على أساس عدد المضادات التي قاومتها	89
13-4	النسق السائد للمقاومة المتعددة للمضادات الحيوية	89
14-4	قيم التركيز المثبط الأدنى M.I.C لبعض المضادات الحيوية (Drug of Choice) في علاج الألتهابات المتسببة عن بكتريا *Klebsiella pneumonia*	92
15-4	تحمل بكتريا *Klebsiella pneumonia* لتراكيز بعض المعادن الثقيلة / ملي مول .	94
16-4	النسب المئوية لمقاومة العزلات قيد الدراسة لبعض من المضادات الحياتية والمعادن الثقيلة	96
17-4	التحليل الأحصائي للعلاقة بين مقاومة المضادات الحيوية والمعادن الثقيلة لعزلات *Klebsiella pneumonia* قيد الدراسة	97
18-4	إنتقال المحددات المسؤولة عن مقاومة المضادات الحيوية والمعادن الثقيلة وأنزيمات البيتا لاكتاميز عن طريق الأقتران البكتيري	102
19-4	نسبة إنتقال المقاومة للمضادات الحياتية والمعادن الثقيلة خلال عملية الأقتران البكتيري	104

قائمـــــة الأشـــكال

رقم الشكل	العنــوان	الصفحة
1-2	التركيب الكيميائي للـ Imipenem and Meropenem	26
2-2	أنظمة الدفق (EFFux) لمعادن الكوبلت , الكادميوم والزنك	29
3-2	سُمية النحاس لخلايا الأحياء المجهرية	30
4-4	نتيجة تشخيص بكتريا *K.pneumoniae* بنظام Api20NE	68
5-4	أختبار التحري عن إنتاج البكتريوسين للعزلة *K.pneumoniae 112*	75
6-4	اختبار التحري عن إنتاج الغشاء الحيوي للعزلة *K.pneumoniae* 46	76
7-4	النسب المئوية للعزلات المنتجة وغير المنتجة لأنزيم البيتالاكتاميز	78
8-4	النسبة المئوية للعزلات المنتجة وغير المنتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز الواسعة الطيف .	79
9-4	أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف للعزلة المحلية *K.pneumoniae*	80
10-4	النتيجة الموجبة لإنتاج أنزيمات البيتالاكتاميزالمعدنية للعزلة المحلية *K.pneumoniae*	82
11-4	النسب المئوية لمقاومة بكتريا *K.pneumoniae* للمضادات الحيوية المختلفة	87
12-4	النسب المئوية لمقاومة بكتريا *Klebsiella pneumonia* لمجموعة من المعادن الثقيلة	95
13-4	المحتوى البلازميدي للخلايا الواهبة والمستلمة والخلايا المقترنة	100

المحتويـــــــات

التسلسل	الموضوع	الصفحة
الفصل الأول : المقدمة		
1	المقدمة	1
الفصل الثاني : أستعراض المراجع		
2	استعراض المراجع	4
1.2	العائلة المعوية	4
2.2	بكتريا الكليبسيلا	4
1.2.2	تصنيف بكتريا الكليبسيلا	4
3.2	وبائية بكتريا الكلبسيلا	5
4.2	الأمراضية	6
5.2	عوامل الضراوة	7
1.5.2	مستضدات المحفظة	7
2.5.2	القدرة على الالتصاق	8
3.5.2	الهيمولايسين البكتيري	9
4.5.2	أنزيم اليوريز	10
5.5.2	البكتريوسين	10
6.5.2	الغشاء الحيوي	11
6.2	المضادات الحيوية	12
1.6.2	مضادات البيتا لاكتام	13
1.1.6.2	البنسلينات	13
1.1.1.6.2	البنسلينات محددة الطيف	13
1.1.1.1.6.2	البنسلينات الطبيعية	13
2.1.1.1.6.2	البنسلينات ضد المكورات العنقودية	13
2.1.1.6.2	بنسلينات واسعة الطيف	13
3.1.1.6.2	البنسلينات اليوريدية	14
4.1.1.6.2	البنسلينات الكاربوكسيلية	14
2.6.2	السيفالوسبورينات	14
1.2.6.2	سيفالوسبورينات الجيل الأول	14
2.2.6.2	سيفالوسبورينات الجيل الثاني	15

3.2.6.2	سيفالوسبورينات الجيل الثالث	15
4.2.6.2	سيفالوسبورينات الجيل الرابع	15
5.2.6.2	سيفالوسبورينات الجيل الخامس	16
1.3.6.2	مجموعة المونو باكتام	16
2.3.6.2	الكاربابنيم	16
4.6.2	مجموعة المضادات الأمينوكلايكوسيدية	18
5.6.2	الكوينولونات	18
6.6.2	السلفوناميد والتراي مثبريم	18
7.6.2	الكلورامفينيكول	19
8.6.2	التتراسايكلين	19
9.6.2	النيتروفيوانتوين	19
10.6.2	الريفامبسين	20
7.2	مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية	20
8.2	الأنزيمات المثبطة للمضادات الحيوية	21
9.2	أنزيمات البيتالاكتاميز	22
1.9.2	تصنيف أنزيمات البيتالاكتاميز	22
2.9.2	فعالية أنزيمات البيتالاكتاميز	23
10.2	العوامل الوراثية المسيطرة في إنتاج البيتالاكتاميز	23
1.10.2	أنزيمات البيتالاكتاميز الكروموسومية	23
2.10.2	أنزيمات البيتالاكتاميز البلازميدية	24
3.10.2	أنزيمات البيتالاكتاميز التي تتوسطها الترانزبوسونات والأنتكرونات	24
11.2	أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف	25
12.2	انزيمات البيتالاكتاميز المعدنية	26
13.2	المعادن الثقيلة وعلاقتها بالأحياء المجهرية	27
14.2	البلازميدات والأقتران البكتيري	31
	الفصل الثالث : المواد وطرائق العمل	
3	المواد وطرائق العمل	33
1.3	الأجهزة والمواد	33
1.1.3	الأجهزة المستعملة	33
2.1.3	المواد الكيمياوية والبايولوجية	34
3.1.3	الأوساط الزرعية المستخدمة	35
4.1.3	المضادات الحيوية	35
1.4.1.3	أقراص المضادات الحيوية المستخدمة وأقطار منطقة التثبيط القياسية	35
2.4.1.3	مساحيق المضادات الحيوية	36

3.4.1.3	أملاح المعادن الثقيلة	36
5.1.3	العدد التشخيصية	36
1.5.1.3	عدة التشخيص	36
2.5.1.3	دم بشري صنف AB مجهز من مصرف دم / ديالى	36
3.5.1.3	عدة أستخلاص الدنا	36
4.5.1.3	السلالة القياسية	37
5.5.1.3	أنواع البكتريا المرضية تحت الأختبار	37
2.3	طرائق العمل	37
1.2.3	تحضير المحاليل والكواشف والصبغات	37
1.1.2.3	المحلول الملحي الفسلجي	37
2.1.2.3	محلول ثابت العكورة القياسي	38
3.1.2.3	محاليل المضادات الحيوية	38
4.1.2.3	محاليل المعادن الثقيلة	38
5.1.2.3	محاليل الكشف عن أنزيم البيتا لاكتاميز	40
1.5.1.2.3	محلول النشأ	40
2.5.1.2.3	محلول اليود	40
3.5.1.2.3	محلول البنسللين ج	40
6.1.2.3	محاليل عزل الدنا البلازميدي	41
7.1.2.3	محاليل الترحيل الكهربائي	41
8.1.2.3	محلول ملحي مستعمل في جهاز VITEK 2	42
9.1.2.3	محلول (0.5)M EDTA	42
2.2.3	الكواشف المستخدمة في تشخيص البكتريا	42
1.2.2.3	كاشف الكاتاليز	42
2.2.2.3	كاشف الأوكسيديز	42
3.2.2.3	كاشف كوفاكس	43
4.2.2.3	كاشف أحمر المثيل	43
5.2.2.3	كاشف فوكس بروسكار	43
3.2.3	الصبغات	43
1.3.2.3	صبغة كرام	43
2.3.2.3	صبغة النكروسين	44
4.2.3	الأوساط الزرعية	44
1.4.2.3	وسط أكار الدم	44
2.4.2.3	وسط أكار اليوريا	44
3.4.2.3	وسط نقيع القلب والدماغ السائل	45

4.4.2.3	وسط نقيع القلب والدماغ الصلب	45
5.4.2.3	وسط الأقتران البكتيري	45
6.4.2.3	وسط المثيل الأحمر – فوكس بروسكاور السائل	45
7.4.2.3	وسط الحركة	45
8.4.2.3	وسط أحمر الكونكو المتصلب بمادة الأكار	45
9.4.2.3	وسط سيانيد البوتاسيوم	46
10.4.2.3	وسط تربتيكيز صويا أكار	46
11.4.2.3	وسط أنزيم تميع الجيلاتين	46
12.4.2.3	وسط حفظ العزلات	46
13.4.2.3	وسط إدامة العزلات البكتيرية	47
3.3	جمع العينات	47
4.3	تشخيص العزلات البكتيرية	47
1.4.3	التشخيص المظهري	47
2.4.3	الصفات المجهرية	48
3.4.3	الفحوصات الكيموحيوية	48
4.4.3	تشخيص البكتريا بأستخدام عدة التشخيص APi 20 E Kit	50
5.4.3	تشخيص البكتريا بنظام VITEK 2	53
5.3	التحري عن بعض عوامل الضراوة في بكتريا *Klebseilla pneumonia*	55
1.5.3	التحري عن وجود المحفظة	55
2.5.3	اختبار الانزيم الحال للدم	56
3.5.3	التحري عن أنزيم اليوريز	56
4.5.3	التحري عن قابلية البكتريا على إنتاج البكتريوسين	56
5.5.3	طريقة احمر الكونكو	56
6.3	فحص الحساسية للمضادات الحيوية	57
7.3	التحري عن إنتاج أنزيم البيتا لاكتاميز	58
1.7.3	تحضير العالق البكتيري	58
2.7.3	أستخدام طريقة اليود القياسية السريعة	58
8.3	التحري عن أنزيمات البيتا لاكتاميز واسعة الطيف	59
9.3	التحري عن قابلية البكتريا لإنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز المعدنية	59
10.3	تحديد العزلات المتحملة للمعادن الثقيلة	60
11.3	قياس التركيز المثبط الأدنى	61
12.3	أستخلاص الدنا البلازميدي	62
13.3	الترحيل الكهربائي للدنا البلازميدي في هلام الأكاروز	63

14.3	عملية الاقتران البكتيري	63
15.3	طريقة الأقتران البكتيري في الوسط الصلب حسب طريقة Seldeen 1999	64
16.3	الاقتران البكتيري في الوسط الصلب حسب طريقة Miller 1972	65
17.3	التحليل الأحصائي بأستخدام نظام SPSS	66
	الفصل الرابع : النتائج والمناقشة	
4	النتائج والمناقشة	67
1.4	عزل وتشخيص بكتريا *Klebsiella spp.*	67
1.1.4	الفحص المجهري	67
2.1.4	الأختبارات الكيموحيوية للبكتريا	67
3.1.4	تشخيص بكتريا *K.pneumoniae* بجهاز ViTEk2	68
4.1.4	توزيع العزلات حسب موضع الإصابة	70
2.4	التحري عن عوامل الضراوة	71
1.2.4	المحفظة	71
2.2.4	إنتاج الهيمولايسين	71
3.2.4	إنتاج أنزيم اليوريز	72
4.2.4	إنتاج البكتريوسين	72
5.2.4	إنتاج الغشاء الحيوي	75
3.4	التحري عن إنتاج أنزيمات البيتا لاكتاميز	77
4.4	التحري عن أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف	79
5.4	التحري عن إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميزالمعدنية	80
6.4	مقاومة البكتريا لمضادات الحيوية بطريقة الأقراص	83
7.4	المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية	87
8.4	النسق السائد للمقاومة المتعددة لبكتريا *K.pneumoniae* للمضادات الحيوية	89
9.4	تحديد التراكيز المثبطة الدنيا لعدد من المضادات الحيوية	91
10.4	تحمل بكتريا *K.pneumoniae* لبعض المعادن الثقيلة	93
11.4	العلاقة بين مقاومة العزلات للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة	95
12.4	النسق البلازميدي لبكتريا *K.pneumoniae*	97
13.4	الأقتران البكتيري	98
15.4	إنتقال صفة إنتاج أنزيمات البيتا لاكتاميز	101
16.4	إنتقال صفة مقاومة المضادات الحيوية والمعادن الثقيلة	101

الاستنتاجات والتوصيات	
الاستنتاجات	105
التوصيات	106
المصادر	
المصادر العربية	107
المصادر الاجنبية	108

الفصل الأول

المقدمة

الفصل الثاني

استعراض المراجع

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

الاستنتاجات
والتوصيات

المصادر

الملاحق

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 .

الفصل الثاني/ أستعراض المراجع

2. أستعراض المراجع

1.2 العائلة المعوية (*Enterobacteriaceae*) :

تضم العائلة المعوية أعداداً كبيرة من البكتريا ذات صفات مشتركة منها أنها سالبة لصبغة كرام، عصوية الشكل، الموطن الطبيعي لها أمعاء الإنسان والحيوان وتتضمن العائلة أجناس مرضية عديدة اهمها *shigella*، *Salmonella*، *Klebsiella* وغيرها، وقسم منها تكون فلورا طبيعية مثل *E.coli*، وأفراد هذه العائلة تكون اما هوائية أو لا هوائية اختيارية ومخمرة لمدى واسع من الكربوهيدرات وتحتوي على تراكيب مستضدية معقدة وتنتج أنواعاً مختلفة من السموم وعوامل الضراوة (Brooks *et al.*,2007).

2.2 بكتريا الكليبسيلا .*Klebsiella* spp :

يعود جنس الكليبسيلا الى العائلة المعوية، وقد تم عزل هذه البكتريا لأول مرة من قبل العالم فريد لاندر (Friedlander) من إلتهاب الرئة في عام 1882، وعرفت مسبباً مرضياً للأخماج الوبائية والمتوطنة في المستشفيات خلال فترة الخمسينات من القرن الماضي (Podschun and Ullmann,1998)، تنمو هذه البكتريا في درجة حرارة (12 – 43) مْ والدرجة المثلى لنموها حوالي (37) مْ، وتقتل بدرجة حرارة (55) مْ لمدة نصف ساعة (Greenwood *et al*.,2007).

تنتشر هذه البكتريا بشكل واسع في الطبيعة وتعزل من مواطن مختلفة مثل أجزاء من جسم الإنسان، والحيوانات، ومياه المجاري، والتربة، والبحيرات، والمياه المالحة، والمياه العذبة، وعموما فهي ممرضات أنتهازية للإنسان والحيوانات (Kumar *et al.*,2011).

1.2.2 تصنيف بكتريا الكليبسيلا :

صنفت بكتريا الكليبسيلا بأنظمة تصنيفية مختلفة ومن هذه الأنظمة :

Bascomb ، Orskov،Cowan وتختلف التسمية من بلد لآخر، إذ تسمى *Klebsiella pneumonia* في الولايات المتحدة حسب تصنيف Orskov، وتسمى البكتريا *Klebsiella aerogenes* في بريطانيا التي تفضل تصنيف *Cowan*، ولكن معظم الدول الأوربية تتبع تصنيف Orskov إذ هو السائد على نطاق العالم (Podshun and ullnann,1998).

أما أنظمة التصنيف الحديثة فقد أعتمدت على أساس التماثل في الحامض النووي (DNA homology) (Tortora *et al.*,2004) .

Kingdom : Bacteria

Phylum : Proteobacteria

Class : Gammaproteobacteria

Order : Enterobacteriales

Family : Enterobacteriaceae

Genus : Klebsiella

يضم جنس الكليبسيلا الأنواع الآتية :

K.onzaenae و *K.ornithinolytica* و *K.terrigena* و *K.trevisanili* و *K.variicola* و *K.planticola* و *K.oxytoca* و *K.singaporensis* و *K.mobilis* و *K.pneumoniae K.rhinoscleromatis* و *K.granulomatis* .

3.2 وبائية بكتريا الكليبسيلا Epidemiology *of Klebsiella* :

تنتشر هذه البكتريا بشكل واسع في الطبيعة، فهي تمتلك نوعين من المواطن الشائعة، الموطن الأول يمثل البيئة إذ تتوافد في المياه السطحية والمجاري والتربة وعلى سطوح الفواكه والحبوب والخضروات (Podschun and Ullmann,1998) والموطن الآخر هو بيئة المستشفيات والسطوح المخاطية في اللبائن، وتعد الأمعاء أهم الأماكن لتوافر هذه البكتريا بشكل طبيعي (Vincent,2004)، هناك ثلاثة طرق للأصابة بالـ *Klebsiella pneumonia*، أما عن طريق التلامس بين المرضى والأشخاص والبيئة المحيطة بهم، أو عن طريق الهواء عبر

رذاذ المرضى، أو عن طريق أبتلاع البكتريا مع الأطعمة والمشروبات الملوثة في المستشفى (Doebbeling ,1993) .

أدى الأستعمال الواسع للمضادات الحيوية واسعة الطيف بصورة غير منتظمة الى ظهور سلالات من بكتريا *Klebsiella* تملك مقاومة متعددة للمضادات، وقد يكون أحد الأسباب هو إنتاجها أنزيمات البيتا لاكتاميز الواسعة الطيف (Paterson,2000; Rajeshwari *et al.*,2010)

تشير الأحصاءات أن بكتريا الكليبسيلا تسبب 3% من الأمراض الوبائية، وتسبب هذه البكتريا 14% من حالات تجرثم الدم Bacteremia . (Nadasy *et al*,.2007) .

4.2 الأمراضية .Pathogenicity *of Klebsiella* spp :

الإمراضية (Pathogenicity): هي قدرة البكتريا على إحداث المرض، إن الأمراض التي تسببها هذه البكتريا هي الأمراض المكتسبة في المستشفيات ومنها ألتهاب القناة البولية والقناة التنفسية وجروح العمليات والسحايا (Douglas,2008; Taloro,2008) وتعد بكتريا الكليبسيلا المسبب الثاني لتجرثم الدم وتعفن الدم القاتل (Septicemia) في الأطفال والأطفال حديثي الولادة، والإصابة بأمراض حادة وخاصة في الأشخاص الذين يعانون من ضعف الجهاز المناعي بسبب داء السكري، أمراض القلب المزمنة، وتضيق الأوعية الرئوية، وخاصة في الأشخاص كبار السن والأطفال حديثي الولادة، وأن معظم أصابات الكليبسيلا في المستشفيات تكون عالية الوفيات إذا لم تعالج بالشكل الصحيح (Damian *et al.*,2009) .

تسبب هذه البكتريا أيضاً اصابات الأذن الوسطى وأصابات الأغشية المخاطية الطرية وتنخر الأنف وأصابات الرئتين (Kumar and Talwar, 2010) ، وتعد بكتريا الـ *Klebsiella pneumonia* من الممرضات الأنتهازية التي ترافق الأشخاص الذين يعانون من مرض الكبح المناعي والذين يعانون من مختلف أصابات ألتهاب المجاري البولية (Rajeshwari *et al.*, 2010) ، وتسبب أيضاً خُراج الكبد القيحي Pyogenic Liver abscesses، وأن 60-80% من عزلات *K.pneumoniae* المسببة لهذا المرض تحتوي

على نوع K1 capsular type وأن من 10-14% منها تحتوي على K2 capsular type (Hsieh *et al.*,2012) .

5.2 عوامل الضراوة Virulence factors :

الضراوة (Virulence): هي مقياس قدرة البكتريا على إحداث المرض، إن عوامل الضراوة لدى بكتريا الـ Klebsiella هي مستضدات المحفظة (Damian *et al.*,2009) ، ومتعدد السكريد الشحمي Lipopoly saccharides (LPS) ، والبكتريوسين Bacteriocin (Brisse *et al.*,2009) ، والغشاء الحيوي Biofilm.

1.5.2 مستضدات المحفظة Capsule Antigen :

تصنع العديد من انواع البكتريا كميات كبيرة من مواد خارج خلوية مؤلفة من متعدد السكريد ويطلق عليها مصطلح (Capsule) أو المادة المخاطية (Slime layer) وهي وحدات متكررة من متعدد السكريد تتكاثف بهيأة طبقة وثيقة الأرتباط وتحيط بالخلية البكتيرية (Brooks *et al.*,2007) .

تعد المحفظة في بكتريا الـ *Klebsiella* من عوامل الضراوة الأساس لإحداث الأمراضية في الإنسان (Damian *et al.*,2009) .

تحتوي المحفظة على حامض Hyaluronic acid كما في بكتريا *Streptococcus* أو حامض الـ Sialic acid مثل بكتريا *Neisseria meningitis*، وتقوم المحفظة بدور أساس بحماية البكتريا ضد آلية الجهاز المناعي وذلك بمقاومتها للمتمم (Clements *et al* .,2008).

ليست كل الأنماط المصلية مرتبطة بالإمراضية في هذه البكتريا، إلا أن النمطين المحفظيان K2,K1 مسؤولين عن أصابات القناة التنفسية في الإنسان، أما الأنماط المصلية K8,K9,K10,K24 فهي مسؤولة عن إصابات المجاري البولية (Brooks *et al.*,2004)

أكد الباحث Ho وجماعته (2011) أن الأنماط المصلية K1,K2 لبكتريا *K.pneumoniae* لها دور ضار في الأصابات المكتسبة في المستشفيات خصوصاً مع

مرضى السكري، كما أكد أيضاً أن النمط المصلي K1 للبكتريا نفسها قد وجدت لدى المرضى المصابين بخراج الكبد القيحي Pyogenic Liver abscess .

2.5.2 القدرة على الإلتصاق Ability of Adhesion :

تعتمد معظم البكتريا على قدرتها للإلتصاق بالسطوح المخاطية وتعد الخطوة الأولى لحدوث الإصابة، وبدون عوامل الإلتصاق فإن مسببات الأمراض في البلعوم والأمعاء والجهاز البولي تُجرف قبل أن تسبب حدوث المرض (Virella,1997)، إن عامل الضراوة الذي يساعد على الألتصاق هو الخمل الذي يبلغ طوله 10 مايكروميتر وقطره يتراوح بين (1 – 11) مايكروميتر، وتتألف من تحت وحدات بروتينية كروية تُدعى الواحدة منها Pillin يبلغ وزنها الجزيئي (15 – 26) كيلودالتون (Ofek and Doyle,1994)، ويكون الخمل أكثر عدداً من الأسواط إذ تبلغ أعدادها من (100 – 500) تتولد من كل خلية ويكون أسمك وأقصر من الأسواط (Greenwood *et al*.,2007) .

جرى اثبات وجود بروتين الـ pillin بصورة رئيسة على أساس قدرته على تلزين خلايا الدم الحمر لمختلف أنواع الحيوانات، وصنفت خاصية التلزين والإلتصاق في الخمل والشعيرات وذلك بالأعتماد على سكر المانوز (D–Mannose) لأن بقايا المانوز هي أحد مكونات البروتين السكري (Glyco protein) لخلايا المضيف، والتصنيف المعتمد هو النمط الحساس لسكر المانوز Mannose Sensitive Haemagglutinine والنمط المقاوم لسكر المانوز Mannose Resistance Haemagglutinine (Wizemann *et al*.,1999) ، وقد أكد الباحث Sahly *et al*.,2008 الى وجود هذين النوعين في بكتريا الكليبسيلا .

وهناك نوعان شائعان من الخمل:

1–النوع الأول : Type 1 (common) Pilli

ويسمى هذا النوع Colonization Factors Antigen/type 1 – CFA/1 ويوجد هذا النوع في أغلب أنواع العائلة المعوية، ومعظم العزلات من بكتريا الـ *K.pneumoniae* لها القابلية لإنتاج نوعين من الخمل Type 1,Type3 (Struve *et al*.,2005) ويعد النوع

الأول Type 1 أكثر الأنواع التي درست وينتمي الى نمط الـ Mannose Sensitive Haemagglutinine (Stahlhut *et al.*,2009).

2- اهلاب النوع الثالث : (Pili Type 3)

ويسمى (Colonization Factors Antigens/type 3 – CFA/3)، ويدعى هذا النوع الموجود في بكتريا الكليبسيلا بالمقاوم للمانوز Mannose Resistant Heamagglutination (Blackburn *et al.*,2010) ولايشبه بقية الخمل؛ لأنه يلزن خلايا الدم الحمر المعاملة بالتانين (Tannin) فقط، وقد وجد أن هذا النوع له القدرة على الأرتباط مع مختلف خلايا الإنسان وذلك لأن سلالات بكتريا الـ *K.pneumoniae* التي تمتلك هذا النوع من الخمل إستطاعت أن تلتصق مع الخلايا الظهارية للقناة التنفسية والخلايا الظهارية للقناة البولية (Huang *et al.*,2009) .

3.5.2 الهيمولايسين البكتيري Bacterial Heamolysin :

الهيمولايسين عبارة عن Toxin يقوم بتدمير الغشاء الخلوي لكريات الدم الحمراء مما يؤدي الى تحللها ويسبب بذلك تجرثم الدم Bacteremia (Liaw *et al.*,2000).

يصنف الهيمولايسين الى ثلاثة أنواع إعتماداً على قابليته لتحلل كريات الدم الحمر وإحداث الإمراضية، النوع الأول يحلل الأغشية ويطلق على هذا النوع من التحلل بالتحلل الدموي من نوع بيتا (β – haemolysis)، أما النوع الثاني فهو يكون الثقوب في الغشاء الخلوي، وتظهر منطقة ذات لون أخضر حول المستعمرة ويطلق على هذا النوع من التحلل بالتحلل الدموي من نوع (α– Haemolysis)، أما النوع الثالث فإنه يحطم جدار الخلية بالطريقة نفسها التي تعمل فيها المنظفات، وهناك بعض الأنواع لا تظهر تحلل حول المستعمرات توصف بالبكتريا غير المحللة للدم (Non – haemolytic) (Jawetz *et al.*,1982) و(Han *et al.*,2010).

لا يمكن عد الهيمولايسين عامل ضراوة مباشر ولكن من العوامل التي تشترك في الإمراضية في حالات معينة ومع ذلك فأن وجوده يعد عاملاً مهماً لتزويد البكتريا بالحديد فضلاً

عن قابليته في الحث على إفراز الهيستامين، وكذلك له القدرة على تدمير الخلايا سيما كريات الدم البيضاء (الزعاك، 1994).

4.5.2 أنزيم اليوريز Urease Enzyme :

تؤكد الدراسات الحديثة على أهمية اليوريز بوصفه مسبباً مرضياً وعامل ضراوة للعديد من الأنواع البكترية ، وينتج من قبل العديد من الأجناس البكتيرية المسببة لخمج المجاري البولية مثل *Proteus , Klebsiella , Pseudomonas* (Ahmed *et al* .,2003) .

تمثل اليوريا المركب النايتروجيني الرئيس المطروح من جسم الإنسان وكذلك الحيوانات، ويعمل أنزيم اليوريز على تحويل اليوريا الى الأمونيا NH4، وحامض الكاربونيك H2CO3 (Tanaka *et al*.,2003) .

أظهرت الدراسات المتخصصة بالتنظيم الوراثي لمجاميع الجينات ذات العلاقة بإنتاج اليوريز بان إنتاجها يخضع لمجموعتين من الجينات تعرف الاولى بالجينات التركيبية Structural genes وهنالك جين اخر يسيطر على الاستنساخ Transcription يعرف بالجين التنظيمي Regulatory gene ويرمز له *Urer* (Mulrooney and Husinger,2003).

إن بكتريا *K.pneumoniae* لها القابلية على إزالة عنصر الحديد من الجهاز البولي مما يعزز بقائها في بيئته الحامضية وذلك من خلال إنتاجها لأنزيم اليوريز (Maldonado,2007)

5.5.2 البكتريوسين Bacteriocin :

تُعرف البكتريوسينات بأنها مركبات ذات طبيعة بروتينية وتمتلك قابلية لإبادة العديد من أنواع البكتريا أو الحد من نموها (Luders *et al*.,2003)، لاتعد البكتريوسينات عوامل ضراوة مباشرة وإنما تزيد من إمكانية التنافس لدى السلالات المنتجة (Kayaoglu and Qrsavik,2004).

تدخل هذه البروتينات الى داخل الخلية عن طريق مستقبلات خاصة وتقوم بعملية القتل عن طريق تكوين قناة ذات نفاذية للأيونات في العشاء الخلوي، أو تقوم بتقطيع الحامض النووي DNA في أماكن غير مخصصة، أو تثبيط بناء البروتينات عن طريق أنشطار الوحدة 16SrRNA أو تثبيط تصنيع طبقة الببتيدو كلايكان في جدار الخلية (Riley,1998).

يسمى البكتريوسين المنتج من قبل بكتريا الـ *K.pneumonia* (Klebocin) (Riley and Chavan,2007)، إن تأثير البكتريوسين في الخلية البكتيرية الحساسة قد يكون مثبطاً للنمو (Bacteriostatic) (Sarika *et al.*,2010) ، أو قد يكون قاتلاً (Bacteriocidal) (Al-Charrakh[a] *et al.*,2011) .

تشفر أنتاج البكتريوسينات جينات عدة وتُحمل على بلازميد مكون من جينات من ضمنها ثلاثة جينات أولها جين إنتاج البكتريوسين (Bacteriocin gene) ثم جين يُشفر لبروتين المناعة (Immunity gene) وذلك لمنع تأثر الخلية بالبكتريوسين المنتج من قبلها، ثم جين التحلل (Lysis gene) الذي يُشفر لبروتين محلل يُساعد في عملية تحرر البكتريوسين من الخلية المنتجة (Gillor *et al.*,2005) .

6.5.2 الغشاء الحيوي Biofilm :

هو تجمع لأحياء مجهرية مع إفرازاتها الخارج خلوية ويكون هذا التجمع بأشكال عدة، إما بعضها مع بعض بهيأة تجمعات(Aggregates)، أو إنها تلتصق على سطح ما مثل التصاقها على سطح صخرة أو على سطح الأسنان أو على سطح بركة في فراغات دقيقة تسمى الأسطح البينية (Interfaces) (Donlan and Costerton,2002).

تتألف الأغشية الحيوية من نوع واحد من الأحياء المجهرية (Single species) أو من أنواع عدة(Multiple species)، وتختلف الأحياء المجهرية ضمن الغشاء الحيوي مظهريا عن أفرادها في العالق على الرغم من تماثلها وراثيا، وتستجيب الخلايا ضمن الغشاء الحيوي لمتدرج إنتشار المغذيات والنواتج الأيضية، وتوجه أيضها تبعا لموقعها الوظيفي ضمن مجتمع الغشاء الحيوي وتشترك في الإتصال الخلوي (Cell–cell communication) (Cvitkovitch *et al.*,2003)

هناك عوامل عديدة لها تأثير بالتصاق البكتريا تتضمن سطح البكتريا البروتيني ومتعدد السكريد Polysaccharide، وخاصة متعدد السكريد المحفظي (CPS)، والتفاعلات الفيزيوكيمياوية ووجود بروتينات المضيف (Tu Quoc *et al*.,2007) .

توجد علاقة وثيقة بين قدرة البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي وقدرتها على إحداث المرض والتسبب بحدوث التهاب مزمن ، فالبكتريا المكونة للغشاء الحيوي لها قابلية أكبر على استعمار جسم المريض والاقامة فيه وتصبح اقل حساسية للعلاج بالمضادات الحيوية ، وتنتج البكتريا بروتينات مرتبطة بالغشاء الحيوي في اثناء الاصابة (Biofilm –Aassociated Protiens "BAP") إن وجود هذه البروتينات (BAP) يسهل تكوين الغشاء الحيوي المرتبط ببقاء الجرثومة مدة أطول في جسم المريض، ويقوم الجسم المصاب بالاستجابة مناعيا لهذه البروتينات فيلاحظ وجود أجسام مضادة لهذه البروتينات في مصل المريض (Anti – BAP antibodies) (Cucarella *et al*., 2004) .

تستطيع بكتريا الـ *K.pneumoniae* تكوين الغشاء الحيوي، إذ يلعب الخمل من نوع Type 3 Fimbriae دوراً كبيراً في تكوين الغشاء الحيوي الذي يعد مشكلة حقيقية في الأجهزة الطبية وخاصة القثطرة البولية التي تكون سبباً للعديد من الإصابات المكتسبة في المستشفيات (Schroll *et al*.,2010) .

6.2 المضادات الحيوية Antibiotics :

تُقسم مضادات الحياة الى مضادات قاتلة (Bactericidal) لها القدرة على قتل البكتريا وتمنع نموها مجدداً كالبنسلينات والسيفالوسبورينات ومضادات المجموعة الأمينوكلايكوسيدية، ومضادات مثبطة لنمو البكتريا (Bacteriostatic) التي تعمل على إيقاف تكاثر البكتريا كالتتراسايكلين والكلورامفينيكول (Laurence et al .,1997) .

وتختلف هذه المضادات في طيف فعاليتها، فهناك مضادات واسعة الطيف (Broad spectrum) ومنها (Gentamycin , Ampicillin) وتعمل على البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام ومنها ما تكون ذات طيف ضيق (Narrow spectrum) مثل (Erythromycin, Penicillin) وتعمل على نوع محدد من الأحياء المجهرية (Walled,2003) .

1.6.2 مضادات البيتالاكتام :

تعد مضادات البيتا لاكتام من المضادات الأكثر أهمية وذلك لفعاليتها العالية ضد البكتريا حيث تعمل على جدار الخلية البكتيرية وذلك بتحللها ومن ثم موتها، وتتضمن مضادات البيتا لاكتام الـ Pencillins , Cephalosporins , Carbapenems , Monobactams (Guilfoile *et al.*,2007) .

1.1.6.2 البنسلينات Pencillins :

يمكن تصنيف البنسلينات بالأعتماد على السلسلة الجانبية والفعالية ضد المايكروبية الى ما يلي (Mandell *et al.*,1995) .

1.1.1.6.2 البنسلينات محددة الطيف Narrow spectrum pencillins :

التي تضم البنسلينات الطبيعية والبنسلينات ضد المكورات العنقودية .

1.1.1.1.6.2 البنسلينات الطبيعية Natural penicillins :

وتشمل بنسلين جي Penicillin G وبنسلين في Penicillin V. يكون الأول حساساً للعصارة المعوية، بينما يتصف الثاني بمقاومته وثباته فيها (المرجاني ,2011)

2.1.1.1.6.2 البنسلينات ضد المكورات العنقودية Anti Staphylo coccal penicillins :

وتشمل مجموعة من المضادات الحيوية مثل , Cloxacillin , Dioloxacillin Methicillin , Flucloxacillin (Katzung,2001) .

2.1.1.6.2 بنسلينات واسعة الطيف Broad spectrum penicillins :

يطلق عليها البنسلينات الأمينية Amino penicillin وهي من المضادات شبه المصنعة وتشمل كل من الأمبسلين Ampicillin، والأموكزاسلين Amoxicillin ، بالإضافة الى المشتقات الجديدة التي تشملBacmpicillin، Hetacillin ،Cyclocillin (Laurence et al.,1997).

3.1.1.6.2 البنسلينات اليوريدية Uraido penicillins :

تضم مضادات الأزلوسلين (Azlocillin) ، والميزلوسلين (Mezlocillin)، والببراسلين (Piperacillin) (Katzung,2001)، وتتحطم هذه المضادات بأنزيمات البيتا لاكتاميز المنتجة من افراد العائلة المعوية والزوائف (Neu,1991) .

4.1.1.6.2 البنسلينات الكاربوكسيلية Carboxy penicillins :

تضم الكاربنسلين Carbencillin، والتكراسلين Ticrcioullin، (Laurence *et al.*,1997)، ويمتاز هذان المضادان بفعاليتهما ضد بكتريا الـ *E.coli* ولكن تقل هذه الفعالية ضد البكتريا المنتجة للأنزيمات المحللة لها وخاصة بكتريا الـ *K.pneumonia* (Mandell *et al.*,1995).

2.6.2 السيفالوسبورينات Cephalosporins :

تمتلك السيفالوسبورينات فعالية واسعة الطيف أكثر من البنسلينات ضد البكتريا العصوية السالبة لصبغة كرام، والكائنات الأخرى المقاومة للبنسلينات، وتستخدم في حالات الأصابة المتكررة بالبكتريا وتستعمل كبدائل للمرضى الذين يعانون من الحساسية من البنسلين، وتمتاز بمقاومتها لأنزيم البنسلينيز، ولكن ليس للكائنات المنتجة لأنزيم السيفالوسبورينيز (Atlas,1995)، وتقسم السيفالوسبورينات إعتماداً على تركيبها الكيمياوي وفعاليتها الضد مايكروبية الى أجيال عدة (Brooks *et al* .,2007) .

1.2.6.2 سيفالوسبورينات الجيل الأول First generation cephalosporins

تشمل مجموعة من المضادات مثلCephalothin, Cephazolin، ويتم الحصول عليها بإضافة مركبات 3–Acetomethyl وتؤخذ هذه المضادات عن طريق الحقن، أما المضادات التي تعطى فموياً فتشمل Cephalexin , Cephalordin (المرجاني، 2011)، وتستعمل مضادات الجيل الأول لعلاج إلتهاب المجاري البولية، والتنفسية، والجلدية بالرغم من

أن (20–30%) من هذه العزلات تُظهر مقاومة لهذه المضادات (Christopher *et al.*,1991).

2.2.6.2 سيفالوسبورينات الجيل الثاني Second generation cephalosporins :

تضم مجموعة من المضادات مثل Cefoxitin, Cefotetan وتكون فعالة ضد العصويات السالبة لصبغة كرام مثل الـ *Klebsiella , Proteus* ولكنها غير فعالة ضد بكتريا *P.aeroginose* وفعالة ضد البكتريا المنتجة لأنزيمات البيتا لاكتاميز مثل *Haemophilus influenza* التي تسبب إلتهاب الأذن الوسطى والجيوب الأنفية (Brooks et al.,2007)، وتمتاز بأنها أكثر مقاومة لأنزيم البنسلينيز وتكون ذات فعالية جيدة ضد المكورات العنقودية ولكنها غير فعالة ضد بكتريا Enterococci (Katzung,2001).

3.2.6.2 سيفالوسبورينات الجيل الثالث Third generation cephalosporins :

تضم مجموعة من المضادات منها مضاد Cefotaxime, Ceftazidium, Ceftriaxone, Cefixime (Murray et al.,1999)، تمتاز سيفالوسبورينات الجيل الثالث انها فعالة ضد الـ Staphylococci وفعالة ضد العصويات السالبة لصبغة كرام وتصل للجهاز العصبي المركزي وتظهر في السائل الشوكي في حالة الأصابة بالسحايا (Brooks *et al.*,2007).

4.2.6.2 سيفالوسبورينات الجيل الرابع Fourth generation cephalosporins :

مثل مضاد Cefepime الذي يمتاز بفعاليته ضد بكتريا Enterobacter, Citrobacter species التي تكون مقاومة لسيفالوسبورينات الجيل الثالث، والـ Cefepime يملك فعالية واسعة الطيف مقارنة بالـ Ceftazidime ضد بكتريا *P.aeruginosa* (Brooks *et al.*,2007).

5.2.6.2 سيفالوسبورينات الجيل الخامس Fifth generation cephalosporins :

تشمل مضاد الـ Ceftobiprole الفعال ضد بكتريا الـ *S.aureus* المقاومة للمثسيلين (MRSA) وأيضاً فعال ضد بكتريا الـ *Streptococcus pneumonia* المقاومة للبنسلين، ويعطى بالحقن لعلاج أصابات الجلد والأنسجة الرخوة (المرجاني, 2011) .

1.3.6.2 مجموعة المونوباكتام Monobactam :

تملك هذه المجموعة حلقة بيتا لاكتام أحاديه مقاومة لأنزيم β – Lactamase وتكون هذه المجموعة فعالة ضد العصويات السالبة لصبغة كرام ولكنها غير فعالة ضد البكتريا الموجبة لصبغة كرام، ويعد مضاد الـ Aztreonam أول أفراد هذه المجموعة، والمرضى الذين لديهم حساسية من البنسلين بأمكانهم تحمل الـ Aztreonam بدون تفاعلات، ومضاد Aztreonam يشبه مضاد Ceftazidime في فعاليته ضد العصيات السالبة لصبغة كرام، ولكن ليس له فعالية ضد البكتريا الموجبة لصبغة كرام والبكتريا اللاهوائية (Brooks *et al.*,2007).

2.3.6.2 الكاربابنيم Carbapenems :

تضم مجموعة من المضادات منها الـ Imipenem, Maropenem بالإضافة الى المجموعة الحديثة التي تشمل الـ Faropenem (Dalhoff *et al* .,2003)، وتمتاز مضادات الكاربابنيم بتأثيرها القاتل Bactericidal على البكتريا (Ueda and Sunagawa,2003).

يعد مضاد Imipenem أول مضاد من هذه المجموعة يمتاز بفعالية واسعة الطيف ضد البكتريا السالبة لصبغة كرام (Pai *et al.*,2001; Turnidge *et al.*,2002)، ويستعمل لعلاج الحالات المرضية التي تسببها سلالات العائلة المعوية وخاصة المنتجة منها لأنزيمات (ESβLs) (Elouennass *et al*,.2012)، ويعد الدواء المختار Drug of choose لعلاج الأصابات الحادة والشديدة المتسببة عن بكتريا العائلة المعوية وذلك بسبب أستقراريته العالية ضد (ESβLs) و (AMpC) المنتجة من بعض أفراد هذه العائلة (Jiang *et al.*,2012) .

فيما يتعلق بمقاومة البكتريا لمضادات البيتا لاكتام فإنها تمتلك آليات عدة مثل قلة نفاذية الغشاء الخارجي إذ تحتوي البكتريا السالبة لصبغة كرام على بروتينات الغشاء الخارجي Outer membrane proteins (OMPS) المعروف بالثقوب Porins، وتلعب هذه الثقوب دوراً بالسماح لمواد معينة من النفاذ خلالها، وتحصل فيها تغيرات عدة مؤدية الى حدوث انتخاب للمواد المارة إذ يحصل تضيق في أقطار هذه القنوات البروتينية فتحل القنوات الصغيرة OMPC محل القنوات الكبيرة OMPF، وتعد هذه القنوات الممر الرئيس لعبور السيفالوسبورينات والبنسلينات ومجموعة الأمينو كلايكوسيدية (Lee *et al.*,1992) .

إن فقدان Porins من سلالات *K.pneumoniae* المنتجة لأنزيم (ESβLs) يسبب مقاومة Cefoxitin ويزيد المقاومة للسيفالوسبورينات واسعة الطيف expanded – spectrum cephalosporins and Monobactam ويقلل من حساسيتها للـ fluoroquinolones (Garcia-Sureda *et al.*,2011).

من الآليات المهمة الأخرى لمقاومة البكتريا للمضادات هو التحوير في موقع الهدف Alternation of target site، وهذا يحدث في طريقين أولهما حدوث طفرة في الجين الذي يعمل على المضاد الهدف، والآخر هو التحوير الكيمياوي في الأنزيم الذي يعمل عليه المضاد (Guilfoile *et al.*,2007).

تحدث المقاومة لمضادات البيتالاكتام أيضا عن طريق أمتلاك البكتريا أنظمة الدفق Efflux pump system وهي عبارة عن بروتينات تنقل المضادات الحيوية من الخلية الى الخارج، وتكون غشاءً خاصاً يساعد الغشاء الداخلي والفسحة البلازمية على إحتجاز مضادات الحياة وقذفها خارج الخلية البكتيرية، وأن هذه الميكانيكية تلعب دورا مهما في منح المقاومة لمدى واسع من المضادات الحياتية وخاصة في البكتريا السالبة لصبغة كرام (Lambert *et al.*,2001; Mendonca,2009).

4.6.2 مجموعة المضادات الأمينوكلايكوسيدية Aminoglycosides :

تضم مجموعة من المضادات منها Gentamycin, Amikacin, Neomycin, Streptomycin وتتشابه بالخواص الحركية، والدوائية، والتركيبية، والسُمية (المرجاني ,2011) وحال دخول هذه المضادات الى داخل الخلية تعمل على تثبيط تصنيع البروتين وذلك من خلال إرتباطه بموقع الهدف على الوحدة الرايبوسومية الصغيرة Subunit30S (Brooks *et al.*,2007).

5.6.2 الكوينولونات Quinolones :

تقوم مضادات هذه المجموعة بتثبيط أنزيمات ال DNA Gyrase المسؤول على جعل الكروموسوم البكتيري فائق اللف مما يؤدي الى الموت السريع لهذه البكتريا (Brooks *et al.*,2007)، ومن مضادات هذه المجموعة الـ Nalidixic acid إذ يمثل الجيل الأول (Katzung,2001)، Ciprofloxacin , Ofloxacin إذ يمثلان الجيل الثاني (Forrest *et al.*,1988)، أما الجيل الثالث فيشمل Clinafloxacin , Moxifloxacin (Murray *et al.*,1999). أكد الباحث (Yedekci *et al.*,2012) إن أنتشار مقاومة Quinolones تزداد في السلالات المنتجة لأنزيم (ESβLs) وإن نسبة تغيير المقاومة ضد Quinolones تتراوح من 10 – 40% في هذه السلالات.

إن أغلب عزلات بكتريا الكلبسيلا المقاومة للـ Ciprofloxacin نتيجة تغير في الحامض الآميني في بروتين GyrA في الموقع 83 للسيرين (Ser–83) الى الثايروسين والفنيل انلين (Brisse *et al.*,2000).

6.6.2 السلفوناميد والتراي مثبريم Sulfonamides &Trimethoprime :

تقوم هذه المضادات بتثبيط نمو البكتريا حيث تقوم مركبات السلفا بإيقاف نمو البكتريا من خلال تثبيط أنزيم Dihydropteroate Synthetase (DHPS)، ويقوم مضاد Trimethoprime بتثبيط أنزيم Dihydro folate reductase (DHFR) إذ أن هذين الأنزيمين ضروريين في صنع حامض الفوليك (Folic acid) المهم في تصنيع الحامض

النووي في خلايا البكتريا، ويستعمل هذان المضادان في علاج إصابات المجاري البولية (Brooks *et al.*,2007) . وتكون مقاومة trimethoprim من خلال التحوير في الأنزيم الهدف Dihydrofolate reductase من خلال تشفير الجينات *dfr* التي تقع أما على بلازميد أو كروموسوم (Kumar *et al.*,2011).

7.6.2 الكلورامفينيكول Chloramphenicol :

يعد من المضادات المثبطة لنمو البكتريا Bacteriostatic إذ يرتبط مع الوحدة الرايبوسومية 50s فيعمل على تثبيط البروتين وذلك بمنع أستطالت السلسلة الببتيدية وتثبيط أنزيم Peptidyltransferase (Brooks *et al.*,2007)، وتكون مقاومة البكتريا للكلورومفينيكول عن طريق إنتاج أنزيم Chloramphenicol Acetyl Transferase (CATs) ويشفر لإنتاج هذا الأنزيم بلازميدات منها البلازمد IncC Plasmid R55 الموجود في بكتريا K.pneumonia (Cloeckaret *et al.*,2001).

8.6.2 التتراسايكلين Tetracycline:

يعد من المضادات الواسعة الطيف ذات التأثير المثبط للبكتريا Bacteriostatic (Fluit *et al.*,2001)، وتعمل هذه المضادات على تثبيط تصنيع البروتين من خلال الأرتباط بالوحدة الرايبوسومية الصغيرة 30s فينتج عن هذا التثبيط منع إرتباط الـ Aminoacyl–tRNA الى الموقع الخاص بالأرتباط على معقد الرايبوسوم mRNA، وأن مقاومة البكتريا لمضاد Tetracycline تقع تحت سيطرة بلازميد أنتقالي (Brooks *et al.*,2007) .

9.6.2 النيتروفيوانتوين Nitrofuantoin:

وتضم المئات من المركبات المصنعة ولكن القليل منها يستعمل طبياً ومنها مركب Furazolidine الفعال ضد أغلب بكتريا العائلة المعوية ويستخدم لعلاج الإسهال والألتهابات المعوية المعدية البكتيرية (المرجاني , 2011) .

10.6.2 الريفامبسين Rifampicin :

يثبط مضاد الريفامبسين انزيم DNA dependent RNA polymerase ليغلق بناء الحامض النووي الرسولي mRNA وتنشأ المقاومةلهذا المضاد من خلال حدوث طفرات كروموسومية ينتج عنها تغيير في الأنزيم الهدف والذي يؤدي الى قلة ألفة الأنزيم المضاد (Brooks *et al.*,2007).

7.2 مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية:

تمتلك البكتريا نوعان من المقاومة :

1 – المقاومة الطبيعية أو المورثة Natural or Inherent resistance

مثل مقاومة البكتريا السالبة لصبغة كرام لمركب benzyl penicillin بسبب عدم نفاذية جدار الخلية للمضاد (Martindale , 1996) .

2 – المقاومة المكتسبة Acquired resistance، التي تكتسب بإنتقال المادة الوراثية من بكتريا الى أخرى، وتنتقل بطرائق عدة :

أ – الأقتران Conjugation، ويعد الاقتران البكتيري من أكثر الطرق شيوعا لأنتقال بلازميدات المقاومة والضراوة وبصورة سريعة بين المجموعات البكتيرية وهو يحدث بمدى واسع من المضائف بميكانيكيات غير معروفة تماما (المرجاني 2011)، وخلال هذه العملية تنتقل المادة الوراثية من الخلايا الواهبة Donor Cell الى الخلايا المستلمة Recipient Cell، وتحتوي البلازميدات المنتقلة جينات المقاومة للمضادات الحيوية مما يجعل الخلية البكتيرية المستلمة تفقد حساسيتها للمضادات الحيوية (Guilfole *et al.*,2007) .

ب – التحول Transformation، تنتقل المعلومات الوراثية من خلال قطعة الـ DNA من السلالة المانحة الى السلالة المستلمة وبالتالي ظهور صفات جديدة تتوارثها الخلايا المستلمة وعكس الأقتران لاتحتاج الى تماس مباشر بين الخلايا المانحة والمستلمة (المرجاني 2011). معظم الأجناس البكتيرية لاتستطيع إلتقاط الـ DNA الخارجي من البيئة ولكنها تمتلك أنزيم Nuclease الذي يقطع الـ DNA الغريب، ومن البكتريا التي تقبل الـ DNA الخارجي

Heamophilus Influenzae وأنواع جنس الـ *Bacillus* و *Pneumococci* (Greenwood,2007) .

ج – التنبيغ Transduction، وهذه ثالث ميكانيكية ينتقل فيها ال DNA بين الخلايا ويكون بوساطة العاثيات Bacteriophages حيث أن معظم العاثيات تحمل المعلومات الوراثية (The phage genom) (Greenwood , 2007) .

د – العناصر الوراثية القافزة Transposable genetic element، وهي عناصر جينية لها القابلية على القفز من موقع الى موقع أخر للكروموسوم ومن سلالة بكتيرية الى أخرى وهذه العناصر الجينية غالبا ما تحتوي على جينات مقاومة المضادات الحياتية محدثة الكثير من المتغيرات (حذف أو أضافة) على سلاسل ال DNA التي تتحرك ضمنها (Guilfoile *et al.*,2007) .

هـ – الانتكرونات Integrons، وهي عناصر جينية قادرة على دمج أو تحريك حوافظ جينية Gene cassettes بعملية إعادة الاتحاد بوجود أنزيم الـ DNA Integrase وتحمل جينات مقاومة المضادات الحيوية، ولهذه الانتكرونات قابلية على القفز الى جينات جديدة أو بلازميدات اقترانية لتسمح لها بالانتشار بشكل واسع (Guilfoile *et al.*,2007).

8.2 الأنزيمات المثبطة للمضادات الحيوية :

إن مقاومة البكتريا لمضادات البيتالاكتام تشكل مشكلة عالمية كبيرة وأحدى آليات المقاومة هي إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز وخاصة في العائلة المعوية (Al-Gamy,2012)، وتسبب المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية لبكتريا الـ *K.pneumoniae* وأنتاجها لأنزيم (ESβLs) زيادة نسبة الأصابة المكتسبة في المستشفيات وحالات تفشي وبائية في العالم وذلك بسبب إنتقالها بوساطة بلازميدات المقاومة (Prospero *et al.*,2010) .

لقد شُخِص أنزيم Klebsiella pneumonia Carbapenemase (KPC) أول مرة عام 1996 في شمال ولاية كارولينا ثم أخذ بالأنتشار وبصورة مثيرة للقلق في نيويورك ثم على طول الشواطىء الشرقية للولايات المتحدة الأمريكية، وقد سجل ال (KPC) في دول أخرى حيث أنتشر عام 2005 في الصين وأوروبا والمملكة المتحدة، وأن المعلومات الوراثية لأنزيم ال

(KPC) تقع على بلازميد أقتراني (Wendt *et al.*,2010)، ويمنح أنزيم ال (KPC) للبكتريا مقاومة واسعة المدى ضد المضادات الحيوية مثل Penicillin, Cephalosporin, Monobactams , Carbapenems, Aminoglycosides and Fluoroquinolones (Munoz-price et al.,2010) وثُبِت مختبريا أن المضاد الحيوي الوحيد الذي يملك فعالية عالية ضد أنزيم ال (KPC) هو ال Polymyxins (Bratu *et al.*,2005).

9.2 أنزيمات البيتالاكتاميز β-Lactamase enzyme :

تنتمي أغلب أنزيمات البيتالاكتاميز الى عائلة السيرين التي تحتوي على الحامض الأميني السيرين في الموقع الفعال للأنزيم، وهي تشبه أنزيمات البروتينات المرتبطة بالبنسلين (PBPs)، لذا من المحتمل أن تكون أنزيمات البيتالاكتاميز مشتقة من أحد هذه الأنزيمات والداخلة في تصنيع الجدار الخلوي، وبعضها الآخر ينتمي لمجموعة أنزيمات البيتالاكتاميز المعدنية التي تتضمن أيونات معدنية مثل الزنك الضرورية لفعاليتها كما هوالحال في أنزيمات البيتالاكتاميز المنتجة من بكتريا *Bacillus sereus* (Livermore and Yuan,2004)، وربما تكون أنزيمات البيتالاكتاميز مشتقة من أحد الأنزيمات الداخلة في تصنيع طبقة الببتيدوكلايكان (Koch,2000)، وتمتلك كل من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام القدرة على أنتاج هذه الأنزيمات إذ تتحرر الأنزيمات من البكتريا الموجبة للصبغة الى خارج الخلية، بينما في البكتريا السالبة لصبغة كرام تنتج هذه الأنزيمات في الفسحة البروتوبلازمية أي تكون من النوع المرتبط بالخلية (Cell bound enzyme) (Kfoury and Araj,2003) .

1.9.2 تصنيف أنزيمات البيتالاكتاميز Classification of β-Lactamase

هناك أربع مجاميع من أنزيمات البيتالاكتاميز :

المجموعة الأولى: Cephalosporinases المشفرة كروموسوميا والتي تكون ضعيفة التثبيط بوساطة Calvulenic acid .

المجموعة الثانية: وفيها تنتمي أنزيمات البيتالاكتاميز الى الصنفين A,D والتي دائما ما تثبط مباشرة على الموقع الفعال للأنزيم بمثبطات البيتالاكتاميز .

المجموعة الثالثة: Metallo β– lactamase الذي يحلل cephalosporins،penicillins ، carbapenems ولايثبط بمثبطات البيتالاكتام بأستثناء Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ، ومركب ρ –chloromercuribenzoat (ρCMB) ويتطلب وجود الزنك أو أي معدن ثقيل.

المجموعة الرابعة: Penicillinases الذي لايثبط بوساطة الـ Calvulenic acid (Mendonca, 2009).

2.9.2 فعالية أنزيمات البيتالاكتاميز:

يكون عمل أنزيمات البيتالاكتاميز مشابهاً لأنزيم Transpeptidase، وهناك مراحل عدة في تطور انزيمات (PBPs) إذ تحولت من endo Transpeptidase الى أنزيمات البيتالاكتاميز بتغير في موقع الهدف، وكذلك تعرف هذه الأنزيمات d,d–carboxy peptidase أو Hydrolyaces ، وتشير الدراسات التطورية للأحماض الأمينية الى أن أنزيمات البيتالاكتاميز جميعها تنحدر من PBP واحد، وكذلك تشير الدراسات الى أن أنزيمات البيتالاكتاميز موجودة في البكتريا قبل وقت العالم Fleming (المرجاني , 2011) .

10.2 العوامل الوراثية المسيطرة في إنتاج البيتالاكتاميز

1.10.2 أنزيمات البيتالاكتاميز الكروموسومية Chromosomal β–Lactamase

تنتج معظم أنواع البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام أنزيمات يشفر عنها كروموسوميا والتي تقسم الى نوعين:

الأول: أنزيمات منتظمة التكوين (Constitutive) وهذه الأنزيمات تصنع بشكل منتظم ومستمر من دون الحاجة الى تحفيز المادة الأساس، وتكون الكمية المنتجة أما قليلة أو عالية جدا وتنتج هذا النوع من الأنزيمات الكثير من الأجناس البكتيرية مثل *E.coli, Salmonella*، *Shigella* (Arakawa *et al.*,1984) .

الثاني: فهي أنزيمات محفزة بوجود محفز (Inducer) وتسمى أنزيمات عالية التحفيز high inducible enzyme، وذلك لتحولها من قليلة الى عالية الأنتاج الأنزيمي ويخضع أنتاج هذا النوع من الأنزيمات لجينات تركيبية Structural gens ينظم عملها جين كابح وجينات تنظيمية Regulatory gens، وأن حدوث طفرة وراثية في الجينات التنظيمية أو الجين الكابح المنظم يؤدي الى زيادة أنتاج هذا النوع من الأنزيمات (Benett and Chapro,1993) .

2.10.2 أنزيمات البيتالاكتاميز البلازميدية β–Lactamase – plasmid – mediated:

هنالك أنواع عدة من البلازميدات أهمها من الناحية السريرية البلازميدات الحاملة لجينات مقاومة المضادات الحيوية وجينات الضراوة ، ويمكن تقسيمها الى مجموعتين:

البلازميدات الإقترانية (Conjugative plasmids) وتمتاز بقابليتها على الأنتقال الذاتي لأحتوائها على نوعين من الجينات تساعد الأولى في عملية الأتصال، والنوع الثاني يسمى Tra gens ويساعد البلازميدات على الأنتقال من الخلية الواهبة (الذكرية) الى الخلية المستلمة (الأنثوية) عبر الجسور الرابطة، والبلازميدات غير الأقترانية Nonconjugative plasmids، وهي غير قابلة للأنتقال ولكنها يمكن أن تكون محركة بوساطة بلازميدات إقترانية أخرى عندما تكون منطقة التعبئة لها (Mobilizing region) فعالة (Tortora *et al.*,2007; Ryan and Ray,2004) .

3.10.2 أنزيمات البيتالاكتاميز التي تتوسطها الترانزبوسونات والأنتكرونات:

ينتقل الترانسبوزون من بلازميد الى آخر ومن بلازميد الى كروموسوم وبالعكس تحدث طفرة بعد إنغرازها في موقع وتسلسلات تسمى التسلسلات الهدف Target sequence وهي تزود البكتريا بإمكانية التكيف في بيئات معينة مثل المستشفيات وتصبح البكتريا مقاومة نتيجة أنتقال جين المقاومة أليها بعملية القفز (Prescott *et al.*,2005).

يتألف الأنتكرون من جين يشفر لأنزيم الأنتيجريز مع كاسيتات (Cassette) جين مجاور التي تحتوي بصورة شائعة على جينات مقاومة المضادات الحيوية (Recchia and

Hall,1995)، إن وجود هذه الجينات على الأنتكرون يسمح لها بالحركة مابين البلازميدات والكروموسوم (Jacoby and Munoz-price,2005) .

11.2 أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف Extended spectrum β-Lactamase (ESβLs)

هي أنزيمات لها القابلية على تحليل البنسلينات والجيل الأول والثاني والثالث والرابع من Cephalosporins, Monobactam, Aztreonan، أما Cephamycins مثل Cefoxitin والـ Carbapenems مثل الـ Meropenen, Imipenem لاتتأثر بهذه الأنزيمات (Paterson *et al.*,2005) .

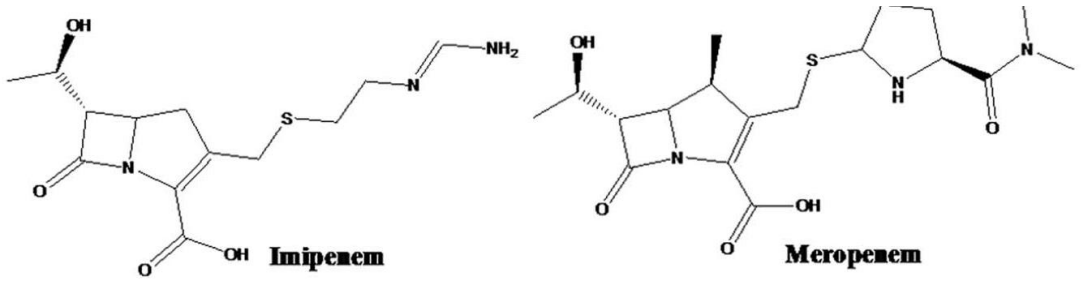
إن البلازميدات المسؤولة عن إنتاج الأنزيمات الواسعة الطيف تشفر لمقاومة المضادات الحيوية، لذلك فأن العزلات المنتجة لهذه الأنزيمات تكون مقاومة لمجاميع متعددة من المضادات الحيوية (Elkholy *et al.*,2011) .

في دراسة أجريت بالهند أثبتت أن أنتاج بكتريا *K.pneumonia* للأنزيمات واسعة الطيف يتراوح من 8 – 80% (Sarojamma and Ramakrishna , 2011)، وأكتشف أن هناك قسم من أنزيمات ESBLs تقع تحت سيطرة جينات قافزة أو أنتكرونات، إذ وجد ترانسبوزون Tn2680 يحمل جينات مشفرة لأنزيم CTX-M14 في بكتريا *K.pneumonia* ووجد أيضا أنتكرون مسؤول عن إنتاج أنزيمات CTX-M9 واسعة الطيف في بكتريا E.coli كما تم عزل أنزيم OXA-28 الواسع الطيف المشفر له جينات محمولة على الأنتكرون (Jacoby and Munoz-Price,2005).

إن الأنزيمات الواسعة الطيف التي يتوسطها البلازميد نوع A شائعة الوجود في العائلة المعوية وخاصة *K.pneumonia* المسببة لذات الرئة والأصابات المكتسبة في المستشفيات والتي تعد مشكلة علاجية كبيرة (Özcelik *et al.*,2008) .

12.2 انزيمات البيتالاكتاميز المعدنية Metallo – β– Lactamase

الكاربابنيم Carbapenem صنف من المضادات الحيوية تتألف من Imipenem، meropenem، Ertapenem، Doripenem التي تعد الملاذ الأمن والمؤثر للعلاج من الإصابات التي تحدث بوساطة البكتريا السالبة لصبغة كرام ذات المقاومة المتعددة، ومقاومة البكتريا للكاربابنيم تحدث بعدة آليات منها إنتاج أنزيم Carbapenemases والوصف الحديث له هو أنزيم Newdelhimetallo–β– Lactamase (NDM–1) الذي يوجد على عناصر جينية متحركة والتي تمنح المقاومة لكل مضادات البيتالاكتام (Wayne,2010).



شكل (2 – 1) : التركيب الكيميائي للـ Imipenem and Meropenem (Wang and Chou,2011)

وهذه العناصر الجينية المتحركة عبارة عن خيط من الـ DNA لها القابلية على الإنتقال من بكتريا الى أخرى بواسطة بلازميد أو ترانسبوزون وعادة ماتمنح هذه الجينات المقاومة لكل من Fluoroquinolones, Aminoglycosides, Trimethoprim–Sulfamethoxazole (Pillai *et al.*,2011).

أول وصف لأنزيم NDM–1 في كانون الأول 2009 لمريض راقد في مستشفى في نيودلهي مصاب ببكتريا *K.pneumonia*، ثم حدد هذا الانزيم في الباكستان والمملكة المتحدة والولايات المتحدة وكندا، وهذا الأنزيم يمنح البكتريا مدى واسع من المقاومة لكل مضادات البيتالاكتام (Wang and Chou,2011) .

ما هو أنزيم NDM-1: هو أنزيم Carbapenemase-Beta Lactamse enzyme يشفر بوساطة أنزيم NDM-1 or NDM-1 gene ^{bla} وهذا الجين يشفر لـ 269 حامض أميني، ويحلل هذا الأنزيم مضادات البيتالاكتام ومقاوم Clavulonic acid والـ Salbactum ومعظم مثبطات البيتالاكتام (Abdulghafur,2010)، وبصورة عامة يقسم ال Carbpenemases الى أربعة أصناف (Poirel *et al.*,2007):

صنف A : أنزيم penicillinases

صنف B : أنزيم Metallolactamases

صنف C : أنزيم Cephalosporinase or ampC

صنف D : أنزيم Oxacillinases

ينتمي NDM-1 لصنف B إذ أن الصفات المميزة لهذا الصنف، أنه يتطلب الزنك على موقعه الفعال ومن هنا جاءت تسميته بالـ Metallo β- Lactamase (Charan *et al.*,2012), يترافق الجين NDM-1 gene ^{bla} مع بقية الجينات المسؤولة عن مقاومة المضادات الحيوية مثل Erythromycin, Ciprofloxacillin, Rifampicin, and Cphloramphenicol وكذلك يترافق مع أنزيمات البيتالاكتاميز الواسعة الطيف صنف CMy-4 وكذلك مع العناصر الجينية التي تشفر لمضخات الدفق، كل هذه المرافقات الجينية تجعل من الـ NDM-1 ^{bla} كثير الخطورة بسبب المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية (Moellering,2010).

13.2 المعادن الثقيلة وعلاقتها بالأحياء المجهرية :

تتطلب خلايا البكتريا تراكيب قليلة من المعادن الثقيلة لأنها ضرورية للتفاعلات الكيموحيوية، إذ التراكيز العالية من المعادن يكون لها تأثير سام على الخلايا، وتستعمل الخلايا البكتيرية تراكيز منخفضة من المعادن (الحديد، والنحاس، والنيكل) في تفاعلات الأكسدة والإختزال ، وبقية المعادن الثقيلة مثل (المغنسيوم والزنك) فإنها تستعمل لأستقرار القوة

الكهروستاتيكية للخلية، وانها ضرورية للـ DNA المرتبط بالبروتين وتحمل أكثر المعادن الثقيلة الشحنة السالبة (Burnley,2000) .

هناك قسم من المعادن الثقيلة ليس لها فعالية بايولوجية بل تعد سامة وقاتلة للأحياء المجهرية وإن كانت بتراكيز ضئيلة مثل (الزئبق، والكادميوم، والفضة والرصاص) .(White,1998)

تأتي سُمية المعادن نتيجة تكوين أواصر تستقر في الموقع الفعال والأساس للأنزيم مثل مجموعة (Sulphyhydryl group) (Hobman,2000)، أو تكوين أواصر في الموقع الفعال للأنزيم مثل (الحديد والنحاس) وهما عوامل مؤكسدة ومختزلة من خلال تكوين جذور وسطية حرة تتفاعل مع مكونات الخلية وتتلفها أو تكوين جذر الهيدروكسيد (OH) ذو السُمية العالية في السايتوبلازم (Gutteridge and Halliwell,1990).

إن آلية تحمل الكائن المجهري للمعادن تتضمن إبعاد المعادن بوساطة الحواجز النفاذية من خلال حجز المواد الداخل أو الخارج خلوية، أغشية النقل الفعال، مضخات الدفق، إزالة السموم الأنزيمية ، إختزال حساسية الخلية الهدف لأيون المعدن، والجينات المسؤولة عن كل هذه العمليات يُشفر لها أما بوساطة كروموسومات أو بلازميدات، مع أن بعض المعادن السامة قد تكون مغذيات دقيقة وأساسية للبكتريا مثل الكوبلت، النحاس، الزنك، النيكل (Bruins *et al*,. 2000).

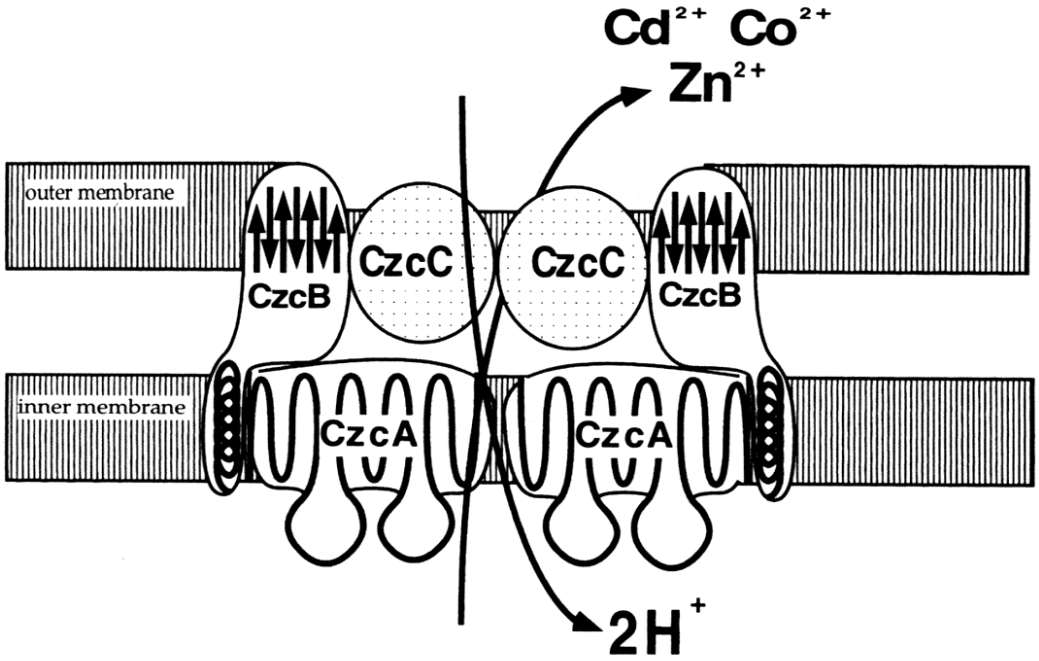
هناك ثلاثة مباديء أساسية لمقاومة البكتريا للمعادن الثقيلة (Dioro *et al*.,1995):

الأول: مقاومة مسؤولة عنها محددات محمولة على بلازميدات ذات خاصية مشابه لتلك الموجودة في مقاومة المضادات الحيوية..

الثاني: فقد وجد أن بعض البكتريا مثل *E.coli* تكون المقاومة عن طريق البلازميدات..

الثالث: هناك محددات كروموسومية مشابه لتلك المحددات المحمولة بلازميديا.

تعتبر أنظمة الدفق (Efflux) أي إزالة السُمية من أكثر ميكانيكيات مقاومة البكتريا للمعادن الثقيلة (Burnely,2000)،شكل(2 – 2).



شكل (2-2): أنظمة الدفق (Efflux) للمعادن الكوبلت والكادميوم والزنك (Burnely,2000).

ومن بين الأحياء المجهرية تعد البكتريا والخمائر والأوالي الفئة الأكثر تعرضا للمعادن الثقيلة الموجودة في البيئة، وتكتسب الأحياء المجهرية عدة ميكانيكيات للتكيف مع وجود المعادن الثقيلة السامة منها إمتصاص المعادن، وتراكم المعادن وقذفها، والترسيب الخارج خلوي، وأكسدة إختزال المعادن الى شكل اقل سُمية (Rajbanshi,2008) .

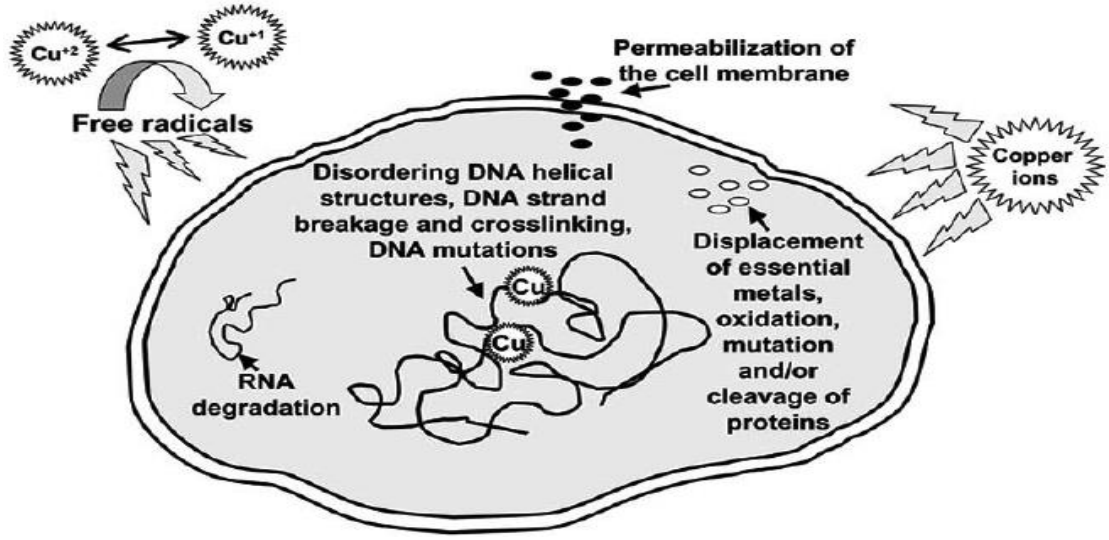
إن المعادن الثقيلة كثيرا ما تولد تفاعلاً نوعياً قوياً مع الأوكسجين reaction oxygen species (ROS) وتسبب بطريقة مباشرة أو غير مباشرة حدوث طفرات جينية لخلايا الكائنات المجهرية، لذلك فإن وجود هذه المعادن قد يكون ضارا للخلايا (Egbebi and Famurewa,2011) .

يعد الزئبق من العناصر الثقيلة وتكون مقاومته بوساطة جينات محمولة على البلازميد ويتم تحويله الى مركبات غير سامة بتأثير أنزيم يعمل على كسر الأصرة (Hg – C) فينتج زئبق غير عضوي (Silver,1996)، ويُشفر لمقاومة الزئبق *mer* Operon (Jaysankar *et al.*,2008).

يعد معدن الفضة من المعادن ذات السُمية القاتلة للخلية البكتيرية الحساسة من خلال التأثير على مكونات سطح الخلية (Haefli et al.,1984) ، وترتبط الفضة بمركبات الخلية مثل ال DNA مما يؤدي الى تثبيط في فعالية البكتريا (Brooks *et al.*,2007).

أشار الباحث Lara et al ,. 2010 أنه بأمكان أستخدام أيون الفضة الذي له تأثير واسع الطيف ضد أنواع البكتريا ذات المقاومة المتعددة للمضادات في منتجات الأدوية وفي الأجهزة الطبية لمنع أنتشار هذه الممرضات في مختلف البيئات السريرية.

فيما يخص النحاس فإن سُميته على الاحياء المجهرية تكون من خلال دورة الأكسدة والأختزال بين Cu^{+2} , Cu^{+1} التي تؤدي الى أنتاج عالي من الجذور الهيدروكسيلية الحرة التي تحطم الدهون والبروتينات والـ DNA وبقية الجزيئات الحيوية (Borkow and Gabbay,2005)، شكل (2-3).



شكل (2-3): سُمية النحاس لخلايا الأحياء المجهرية (Borkow and Gabbay,2005)

لقد أشار الباحث (Castillo –Zacarias *et al.*,2011) أن بكتريا *K.pneumonia* وبكتريا *P.aeruginosa* لهما القابلية على إزالة المعادن من مياه صناعية ملوثة بمعادن الزئبق، والرصاص، والخارصين، والكادميوم بنسبة 24 – 64% في بكتريا *K.pneumonia* وبنسبة 23 – 64% في بكتريا *P.aeruginosa* وهذه تعد خاصية فريدة لهذه الأنواع البكتيرية في تطبيقات المعالجة البايولوجية.

أشارت الباحثة (Shamim *et al.*,2012) أن بكتريا *K.pneumonia* ذات التحمل العالي لمعدن الكادميوم لها القابلية على إزالة المعدن بنسبة 82% من نفايات صناعية سائلة ولذلك يمكن أستعمالها في معالجة مياه الصرف الصحي الملوث للمعادن الثقيلة.

14.2 البلازميدات والأقتران البكتيري Plasmids and bacterial conjugation

تُعرف البلازميدات بأنها عناصر وراثية خارج كروموسومية Extracromosomal genetic elements تمتاز بكونها دائرية وتحتوي على معلومات وراثية تنتقل من خلية بكتيرية الى أخرى عن طرق الأقتران، وتشفر البلازميدات لمعلومات جينية مختلفة منها المقاومة للمضادات الحيوية، وإنتاج البكتريوسين، والمقاومة للأيونات المعدنية السامة، وإنتاج السموم وعوامل ضراوة أخرى (Greenwood *et al.*,2007) .

قد أشار الباحث (Pinsky *et al.*,2009) إن صفة إنتاج المحفظة في بكتريا *K.pneumonia* تكون الجينات المسؤولة عنها محمولة على بلازميد.

يكون دور البلازميدات أكثر أهمية عندما تحمل عناصر وراثية قافزة Transposon تُشفر للمقاومة والتي يمكن أن تنتقل من بلازميد الى آخر ومن بلازميد الى كروموسوم دون الأعتماد على تماثل سلاسل DNA (Riley and Wertz,2001).

تستطيع بعض البلازميدات أن تنتقل من خلية بكتيرية الى أخرى بالأعتماد على نفسها، بينما لاتستطيع بلازميدات أخرى من الأنتقال إلا بمساعدة بلازميدات أخرى، وإذا كان البلازميد يحمل جينات مسؤولة عن تكوين جسر الأقترن فهو بلازميد إقتراني (Conjugative plasmid، أما البلازميد الذي لايحمل هذه الجينات فهو غير إقتراني (Non – conjugative plasmid) وبالتالي لايستطيع الأنتقال الى الخلايا المستلمة (المرجاني ، 2011).

للبلازميدات القابلية على التضاعف الذاتي بدون الأعتماد على كروموسوم المضيف لإحتوائها على منشأ التضاعف تُدعى Replicon ويتميز البلازميد بإنه مستقر وراثيا ويحتوي على جينات من (1–300) جين، والبكتريا الفاقدة للبلازميد تكون طبيعية في وظائفها (Prescott *et al*.,2005) .

تتطلب عملية إنتقال الجينات المحمولة على البلازميدات وجود تماس مباشر بين الخليتين وهما الخلية الواهبة التي تحمل البلازميد والخلية المستلمة التي لاتحمله، تبدأ عملية الأقتران بأن يُشفر البلازميد لتكوين الأهداب الجنسية التي تمتد من سطح الخلية الواهبة للتفاعل مع المستقبل (Receptor) على سطح الخلية المستلمة وعندئذ يتكون جسر الأقتران (conjugal bridge) بين الخليتين لتُشفر بعدها الجينات Tra–genes لأنزيم Nuclease ليقطع أحد شريطي الدنا للبلازميد في موقع يسمى أصل الأنتقال (Origen transfer) بعدها تبدأ النهاية الحرة لشريط البلازميد المقطوع بالعبور خلال جسر الأقتران، وبعد إنتهاء الأقتران ينكسر الجسر الأقتراني ويصبح في كل خلية من الخليتين شريط واحد من الدنا الذي يستنسخ لبناء متمم له بمساعدة أنزيم DNA polymerase المتواجد في كلتا الخليتين (Volk and Benjamin,1986).

إن السلالات المستقبلة تتحول الى سلالات واهبة ولها القابلية على الأقتران مع خلايا أخرى وفي هذه الطريقة فإن البلازميدات تنتشر بسهولة خلال مجتمعات البكتريا مسببة الإمراضية (Greenwood *et al*.,2007).

وقد أشار الباحث (Harajly *et al*.,2010) إن هناك بلازميد عالي الأقتران نوع blactx–m يُشفر للأنزيمات الواسعة الطيف (ESβLs) ينتشر بسرعة بين السلالات المعزولة من العائلة المعوية في كل من كندا واليونان والمملكة المتحدة وإيطاليا، يحمل مقاومة عالية للمضادات الحيوية التي تتضمن Aminoglycosides, Fluoroquinolones, Chloranphenicols , Tetracyclin .

الفصل الثالث/المواد وطرائق العمل

3. المواد وطرائق العمل

1.3 الأجهزة والمواد

1.1.3 الأجهزة المستعملة

أُستعملت في هذه الدراسة الاجهزة المدرجة في القائمة أدناه :

الشركة المصنعة و المنشأ	أسم الجهاز	
Mennert (Germany)	Incubator	حاضنة
Mennert (Germany)	Oven	فرن كهربائي
Mennert (Germany)	Water bath	حمام مائي
Gallen kamp (England)	Millipore filter unit	وحدة ترشيح دقيقة
Hirayama (Japan)	Autoclave	مؤصدة
Olympus (Japan)	Light microscope	مجهر ضوئي
Griffin (England)	Vortex	مازج
Gallen kamp (England)	Distillatar	جهاز التقطير
Gallen kamp (England)	Shaking water bath	حمام مائي هزاز
Mettler (Switzerland)	Sensitive balance	ميزان حساس
Gallen kamp (England)	Centrifuge	جهاز نبذ مركزي
Heraeus (Germany)	Microfuge	جهاز نبذ صغير
Qean (Egypt)	Refrigerator	ثلاجة
Radiometer (Denmark)	PH-meter	مقياس الآس الهيدروجيني
Brand (Germany)	Micropipettes	ماصات دقيقة بأحجام مختلفة
Herolab (Germany)	UV- trans illuminator	مصدر الأشعة فوق البنفسجية
Helena (USA)	Gel Electrophoresis Apparatus	جهاز ترحيل كهربائي
Sony (Japan)	Digital camera	كاميرا رقمية

2.1.3 المواد الكيمياوية والبايولوجية:

استعملت في هذه الدراسة كل من المواد الكيميائية والبيولوجية الاتية:-

المادة		الشركة المصنعة والمنشأ
حامض الكبريتيك	Sulfuric Acid	BDH (England)
كلوريد الباريوم	Barium chloride	BDH (England)
سيانيد البوتاسيوم	Potassium cyanide	Merk (Germany)
كليسيرول	Glycerol	BDH (England)
فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين	KH_2PO_4	BDH (England)
فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين	Na_2HPO_4	BDH (England)
فوسفات الصوديوم احادية الهيدروجين المائية	$Na_2HPO_4.2H_2O$	BDH (England)
نشأ	Starch	BDH (England)
اليود	Iodine	BDH (England)
يوديد البوتاسيوم	Potassium Iodide	BDH (England)
الفا – نفثول	α-Naphthol	BDH (England)
صبغة البلور البنفسجي	Crystal violet stain	BDH (England)
صبغة النكروسين	Nigrosine stain	BDH (England)
صبغة الكونكو الحمراء	Congo red stain	BDH (England)
صبغة السفرانين	Safranine stain	BDH (England)
أكاروز	Agarose	BDH (England)
اثيلين داي أمين تترااسيتك اسيد	Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid	BDH (England)
كلوكوز	Glucose	BDH (England)
سكروز	Sucrose	Merk (Germany)
كلوريد الصوديوم	Sodium Chloride	Fluka (Switzerland)
ببتون	Peptone	BDH (England)
بنسللين جي	Penicillin G	Sundox (Australia)
خلاصة الخميرة	Yeast Extract	Fluka (Switzerland)
كليسيرول	Glycerol	BDH (England)
هيدروكسيد البوتاسيوم	Potassium Hydroxide	BDH (England)
كحول ايزوميلي	Isomyl Alcohol	BDH (England)
حامض الهيدروكلوريك	HCl	BDH (England)
تربتون	Trypton	BDH (England)
بيروكسيد الهيدروجين	Hydrogen peroxide	Oxoid (England)
كحول اثيلي 99%	Ethanol	BDH (England)
فوسفات البوتاسيوم	Potassium Phosphate	BDH (England)
بروميد الاثيديوم	Ethidium Bromide	BDH (England)
حامض البوريك	Boric Acid	Merk (Germany)
دكستروز	Dextrose	BDH (England)
ترس قاعدي	Trise-Base	BDH (England)

3.1.3 الأوساط الزرعية المستخدمة :

استعملت في هذه الدراسة كل من الاوساط الزرعية الاتية:-

الوسط		الشركة المجهزة والمنشأ
وسط الايوسين مثلين الازرق	Eosin Methylene Blue (EMB)	Oxoid (England)
مستخلص الخميرة	Yeast Extract Agar	Himedia (India)
اكار – اكار	Agar-Agar	Oxoid (England)
وسط اكار الصويا	Trypticase Soy Agar	Oxoid (England)
كلكلر اكار	Kligler Iron Agar	Himedia (India)
وسط اكار المغذي	Nutrient Agar	Himedia (India)
مرق نقيع القلب والدماغ	Brain-Heart infusion Broth	Oxoid (England)
اكار نقيع القلب والدماغ	Brain-Heart infusion Agar	Oxoid (England)
وسط اليوريا اكار	Urea Agar	Himedia (India)
وسط سترات السايمون	Simmon Citrate Agar	Oxoid (England)
اكار الدم الاساس	Blood Agar Base	Oxoid (England)
اكار الماكونكي	MacConkey Agar	Oxoid (England)
اكار موللر هينتون	Muller-Hinton Agar	Oxoid (England)
وسط MR/VP	Methyle Red/ Vogas Proskaur	Oxoid (England)

4.1.3 المضادات الحيوية :

1.4.1.3 : أقراص المضادات الحيوية Antibiotic Disk المستخدمة وأقطار منطقة التثبيط القياسية (NCCLS، 2007)

المضاد الحيوي	الرمز	تركيز القرص µg/ml	المنشا	مقاومة R	متوسطة I	حساسة S
Ampicillin	AMP	30	Oxoid (England)	11	13-12	14
Carbencillin	Cb	100	Oxoid (England)	13	16-14	17
Piperacillin	PRL	100	Oxoid (England)	14	17-15	18
Cephalexin	CL	30	Bioanalyse (Turkey)	14	17-15	18
Cefotaxime	CTX	30	Oxoid (England)	14	22-15	23
Aztreonam	ATM	30	Bioanalyse (Turkey)	15	16-21	22
Cefixime	Ce	5	Bioanalyse (Turkey)	21	27-23	22
Imipenem	IMP	10	Bioanalyse (Turkey)	13	15-14	16
Augmentin	AMC	10	Bioanalyse (Turkey)	13	17-14	18
Amikacin	Ak	30	Bioanalyse (Turkey)	14	16-15	17
Gentamycin	GEN	10	Oxoid (England)	12	14-13	15
Ciprofloxacin	CIP	5	Bioanalyse (Turkey)	15	20-16	21
Chloramphenicol	C	30	Bioanalyse (Turkey)	12	17-13	18
Tetracycline	T	30	Oxoid (England)	14	14-12	19
Trimethoprime	TMP	5	Bioanalyse (Turkey)	10	15-11	16
Nitrofurantion	F	300	Bioanalyse (Turkey)	14	16-15	17

2.4.1.3 مساحيق المضادات الحيوية :

المضاد		المنشأ
امبسيلين	Ampicillin	مركز أبحاث الرازي / العراق
ببراسيلين	Piperacillin	معمل أدوية سامراء / العراق
سيفالكسين	Cephalexin	معمل أدوية سامراء / العراق
سيفوتاكسيم	Cefotaxime	معمل أدوية سامراء / العراق
سفتريوكسون	Cefteriaxone	معمل أدوية سامراء / العراق
اميبنيم	Imipenem	الشركة العربية لتصنيع الادوية / الاردن
ازتريونام	Aztreonam	الشركة العربية لتصنيع الادوية / الاردن
امايكاسين	Amikacin	شركة ظفار لأنتاج الادوية / الامارات العربية
اوكمنتين	Augmentin	شركة ظفار لأنتاج الادوية / الامارات العربية
سبروفلوكساسين	Ciprofloxacin	دار الدواء / الاردن
كلورامفنيكول	Chloramphenicol	معمل أدوية سامراء / العراق
ترايمثبريم	Trimethoprime	الشركة العربية لتصنيع الادوية / الاردن

3.4.1.3 أملاح المعادن الثقيلة :

ملح المعدن	الصيغة الكيمائية	الشركة المجهزة والمنشا
كلوريد النحاس	$CuCl_2.2H_2O$	BDH (England)
كلوريد الكوبلت	$CoCl_2.CH_2O$	BDH (England)
كلوريد الزئبق	$HgCl_2$	BDH (England)
كلوريد الزنك	$ZnCl_2$	BDH (England)
كلوريد الفضة	$AgCl_2$	BDH (England)

5.1.3 العدد التشخيصية:

1.5.1.3 عدة التشخيص api 20E Kit

مجهزة من الشركة Bio Meriux وتضم مجموعة من الفحوصات الكيموحيوية

2.5.1.3 دم بشري صنف AB مجهز من مصرف دم / ديالى

3.5.1.3 عدة أستخلاص الدنا DNA purification Kit / Promega

4.5.1.3 السلالة القياسية Standard Strain

السلالة	التركيب الوراثي	المصدر
E.coli MM294	$End^{-}AI.HsdR^{-}.HsdM^{+}.Lac^{+}.\ Thi^{-}.RiF^{r}$	معهد الهندسة الوراثية والتقنية الإحيائية

$^{-}$ end AI: خالية من أنزيمات الدناز الداخلية (endonuclease)، $^{-}$HsdR: خالية من أنظمة التقييد (Restriction negative)، $^{+}$HsdM: وجود أنظمة التحوير، $^{+}$Lac: القدرة على تخمير سكر اللاكتوز، $^{-}$Thi: الحاجة إلى الثايمين، ^{r}RiF:المقاومة للريفامبسين

5.5.1.3 انواع البكتريا المرضية تحت الاختبار

اسم البكتريا المرضية	مكان العزل	المصدر
E.coli	ادرار	مختبر مستشفى بعقوبة التعليمي العام
Pseudomonas aeruginosa	حروق	
S.aureus	قشع	

2.3 طرائق العمل :

1.2.3 تحضير المحاليل والكواشف والصبغات :

حُضرت عدد من المحاليل والكواشف والصبغات, وعُقمت تلك التي تحتاج الى تعقيم بأستخدام جهاز المؤصدة (Autoclave) بدرجة حرارة 121مْ ولمدة 15دقيقة وضغط 15 باوند/انج^{2} ، فيما أستخدمت طريقة الترشيح بالمرشحات الدقيقة (Millipore Filter) بقطر 0.22 مايكروميتر للمحاليل التي تتلف بدرجات الحرارة العالية مثل محاليل السكريات ومحاليل المضادات الحيوية، أما المواد الزجاجية فقد عُقمت بالفرن عند درجة حرارة 180 مْ لمدة ساعتين.

1.1.2.3 المحلول الملحي الفسلجي Normal Saline :

حُضر المحلول الملحي الفسلجي حسب ما جاء في (Forbes *et al* ., 2002) بأذابة 0.85 غم من كلوريد الصوديوم في 90 مل ماء مقطر، ثم أكمل الحجم الى 100 مل، عُقم بالمؤصدة، وحُفظ بدرجة حرارة 4 مْ لحين الأستعمال.

2.1.2.3 محلول ثابت العكورة القياسي Macfarland Standard :

حُضر المحلول وفق ما جاء في (Bauer et al.,1996) كما يلي:-

محلول – أ – أذيب 1.175 غم من كلوريد الباريوم في 90 مل من الماء المقطر، وأكمل الحجم الى 100 مل .

محلول – ب– حُضر 1% من حامض الكبريتيك المركز (H_2SO_4) بإضافة 1 مل من الحامض الى 90 مل من الماء المقطر المعقم، ثم أكمل الحجم الى 100 مل، أُضيف 0.5 من محلول (أ) الى 99.5 مل محلول (ب) رج المحلول بقوة ووضع في أنابيب زجاجية محكمة الغطاء لمنع التبخر وحفظت في الظلام لحين الأستعمال. تمزج محتويات الأنبوبة جيداً قبل كل أستعمال .

3.1.2.3 محاليل المضادات الحيوية :

حُضرت محاليل خزينة (Stock Solutions) بتركيز نهائي مقداره 10 ملغم/ مل حسب ما ورد في (NCCLS,2002) لكل:

Ampicillin,Piperacillin, Cephalexin, Cefotaxime, Ceftriaxone, Imipenem, , Aztreonam , Ciprofloxacin ,Amikacin, Augmentin, Chloramphenicol, Trimethoprime

بأذابة (1) غم من المضاد في (90) مل من الماء المقطر، ثم أكمل الحجم الى (100) مل، أما مضاد Trimethoprime يذوب منه 0.1 غم في كمية من الاسيتون ويكمل الحجم الى 20 مل للحصول على تركيز نهائي 5 ملغم/ مل (الجيلاوي، 2000)، وبالنسبة الى مضادChloramphenicol يذوب منه 0.25 غم في كمية من الاسيتون ويكمل الحجم الى 100 مل للحصول على تركيز نهائي 2.5 ملغم/ مل (Miniatis *et al.*, 1982)، عُقمت هذه المحاليل بالترشيح بوساطة مرشحات دقيقة وحفظت بالثلاجة لحين الأستخدام .

4.1.2.3 محاليل المعادن الثقيلة:

أُستعملت المعادن الثقيلة على شكل أملاح حسب ما ورد في قائمة 3.4.1.3, وأُستخرجت تراكيز المعادن الثقيلة من أملاحها وفق الطريقة الآتية:-

أُستعمل كلوريد الكوبلت ($COCl_2.6H_2O$.) مثالا لأستخراج معدن الكوبلت من كلوريد الكوبلت (Sakoog *et al.*,1988) .

1- إيجاد النسبة المئوية للعنصر في المركب:

الوزن الجزيئي للمركب = 237.9 غم / مول

الوزن الذري للكوبلت = 59 غم / مول

$$\text{النسبة المئوية للكوبلت} = \frac{\text{الوزن الذري للعنصر}}{\text{الوزن الجزيئي للكوبلت}} \times 100$$

$$= \frac{59}{237.9} \times 100 = 24.8\ \%$$

2- إيجاد عدد المولات في المعدن الثقيل :

عدد المولات للعنصر في المركب = النسبة المئوية / الوزن الذري للعنصر

$$= \frac{24.8}{59} = 0.42 \text{ مول من الكوبلت}$$

3- إيجاد وزن العنصر المطلوب (أي عدد الغرامات في المول) :-

عدد المولات	**الوزن الجزيئي للنموذج**
0.42	237.9
1	X

$$X = \frac{237.9}{0.42} = 566.42 \text{ غم / مول (1000 ملي مول)}$$

حُضر تركيز (100) ملي مول بأستعمال قانون التخفيف

التركيز (ت1) X الحجم (ح1) = التركيز (ت2) X الحجم (ح2)

1000 X ح1 = 50 X100

$$\text{ح1} = \frac{50 \times 100}{1000} = 5 \text{ ملي مول من المحلول الذي تركيزه 1000ملي مول}$$

ويكمل الحجم الى 50 مليلتر .

بذلك تم الحصول على محلول خزين من المعدن بتركيز 100 ملي مول وبحجم مقداره 50 مليلتر، ومن هذا المحلول الخزين حُضرت التراكيز المطلوبة في الدراسة بأستعمال قانون التخفيف.

ت1X ح1 = ت2X ح2 .

وبالطريقة ذاتها حُضرت المحاليل الخزينة لسائر املاح المعادن الثقيلة .

5.1.2.3 محاليل الكشف عن أنزيم البيتالاكتاميز.

حُضرت محاليل الكشف عن أنزيم البيتا لاكتاميز بطريقة اليود السريعة Rapid Iodometric Method وذلك حسب ما ورد في (WHO , 1978) والمحاليل هي:-

1.5.1.2.3 محلول النشأ Starch Solution :

حُضر آنياً عند الأستعمال بإذابة 0.1 غم من مادة النشأ في 10 مل من الماء المقطر، نقلت القنينة الى حمام مائي بدرجة حرارة 100مْ لمدة 10 دقائق وذلك للتأكد من ذوبان النشأ، حُفظ المحلول في درجة 4 مْ.

2.5.1.2.3 محلول اليود Iodine Solution:

حُضر بإذابة 2.3 غم من اليود، و 5.32 غم من يوديد البوتاسيوم في 90 مل من ماء مقطر بعدها أكمل الحجم الى 100 مل وحتفظ المحلول في قنينة معتمة ومعقمة بدرجة 4 مْ.

3.5.1.2.3 محلول البنسللين ج Penicillin G Solution:

حُضر بإذابة البنسللين ج في دارئ الفوسفات المتكون من محلولين هما:

المحلول – أ – أُذيب 0.907 غم من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين (KH_2PO_4) في كمية من الماء المقطر، أكمل بعدها الحجم الى 100 مل.

المحلول – ب – أُذيب 0.946 غم من فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين، و1.19 غم من فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين (المائية) في كمية من الماء المقطر، أكمل بعدها الحجم

بالماء المقطر الى 100 مول و بعد ذلك أخذ 87.6 مل من محلول أ، 12.4 مل من محلول ب، خلطا معاً وضبط الرقم الهيدروجيني الى 6.0 بعد تحليل هذا الدارىء ذُوب فيه 0.5693 غم من بنسللين ج (Penicillin G)، عُقم بالترشيح ووزع في عبوات صغيرة وحفظ عند درجة حرارة 20- مْ لحين الأستعمال .

6.1.2.3 محاليل عزل الدنا البلازميدي:

أُستخدمت محاليل عزل الدنا البلازميدي المجهزة من قبل الشركة Promega (USA) وتضم المحاليل الآتية:-

1-Cell LYSIS Buffer (CLC)

2-Neutralization Solution (NSC)

3-Endotoxin Removal Wash (ERB)

4-Column Wash Solution (CWC)

5-Elution BUFFER (EBB)

Kit name : Pure yield ^{TM} Plasmid Miniprep System .

7.1.2.3 محاليل الترحيل الكهربائي Gel Electrophoresis Solutions

- دارىء الترس بوريت TBE :

حُضر بتركيز نهائي 0.089 مولار ترس قاعدي (Tris-base)، 0.089 مولار من حامض البوريك (Boric Acid)، و0.002 مولا من مادة EDTA أكمل الحجم الى 1 لتر من الماء المقطر، ضُبط الآس الهيدروجيني الى 8 وعُقم بالمؤصدة .

- صبغة بروميد الأثيديوم Ethidium Bromide :

حُضر محلول خزين تركيزه 5 ملغم / مل، بإذابة 5 ملغم من صبغة بروميد الأثيديوم في 1 مل من الماء المقطر المعقم، وخفف عند الأستعمال للحصول على تركيز نهائي مقداره 0.5 % مكغم / مل.

- داريء التحميل Loading Buffer :

حُضر بطريقة (kdurna,1990) من 30% كليسيرول، 50 % TBE، 20% ماء مقطر، 0.25 % صبغة بروموفينول الأزرق.

8.1.2.3 محلول ملحي مستعمل في جهاز VITEK 2

حضر هذا المحلول بإذابة 0.5 غرام من كلوريد الصوديوم في 95 مليلتر من الماء المقطر ثم عدل pH إلى 7 وأكمل الحجم إلى 100 مليلتر.

9.1.2.3 محلول EDTA M (0.5)

يحضر هذا المحلول باضافة 186.1غم من مادة الـ EDTA الى 1 لتر من الماء المقطر المعقم، وضبط الاس الهيدروجيني الى 8 باستعمال هيدروكسيد الصوديوم NaOH ، وعقم بالمؤصدة (Bhalerao *et al* ., 2010)

2.2.3 الكواشف المستخدمة في تشخيص البكتريا:

1.2.2.3 كاشف الكاتاليز Catalase Reagent :

حُضر من مزج 1 مل من بيروكسيد الهيدروجين المركز 30% مع 9 مل من الماء المقطر للحصول على تركيز 3% بيروكسيد الهيدروجين، وحفظ في الثلاجة في عبوة داكنة، أستعمل للكشف عن قابلية العزلات البكتيرية قيد الدراسة على إنتاج أنزيم الكاتاليز (Collee *et al.*,1996) .

2.2.2.3 كاشف الأوكسيديز Oxidase Reagent :

حُضر آنياً بأذابة 1 غم من رباعي المثيل بارافنيلين ثنائي الآمين هيدروكلوريد Tetramethyl–P–phenylen diamindihydrochlorid في 90 مل من الماء المقطر المعقم، ومن ثم أكمل الحجم الى 100 مل، أستخدم هذا الكاشف للكشف عن إنتاج أنزيم الأوكسيديز من قبل البكتريا (Koneman *et al.*,1992) .

3.2.2.3 كاشف كوفاكس Kovac's Reagent :

حُضر الكاشف بإذابة 5 غم من مادة Para-dimethyl amino benzaldehyde في 75 مل من كحول أيزو أميلي، ثم أُضيف 25 مل من حامض الهيدروكلوريك المركز ببطيء ليصبح لون الكاشف أصفر شاحباً. خُزن المحلول في الثلاجة في قنينة معتمة، ورج بلطف قبل الأستعمال، أستخدم للكشف عن حلقة الأندول (Baron and Finegold, 1990).

4.2.2.3 كاشف أحمر المثيل (Methyl red reagent) :

حُضر الكاشف بأذابة 0.1 غم من صبغة أحمر المثيل في 300 مل من 95% كحول أثيلي، وأكمل الحجم الى 500 مل بأستخدام الماء المقطر، أستخدم للكشف عن التحلل الكلي لسكر الكلوكوز (Collee *et al.*, 1996).

5.2.2.3 كاشف فوكس بروسكار (Voges-Proskauer reagent)

حُضر الكاشف من:-

أ- كاشف ألفا – نفثول: أُذيب 5 غم من المادة في 90 مل كحول أثيلي 99% ثم أكمل الحجم الى 100 مل.

ب- كاشف هيدروكسيد البوتاسيوم: حُضر بأذابة 40 غم من المادة في 90 مل ماء مقطر ثم أكمل الحجم الى 100 مل، أستخدم للكشف عن التحلل الجزئي لسكر الكلوكوز (Collee *et al.*,1996) .

3.2.3 الصبغات:

1.3.2.3 صبغة كرام:

حُضرت كما ورد في Baron وجماعته 1999 وتكونت من صبغة Crystale Violet ومحلول اليود وكحول الإيثانول وصبغة السفرانين.

2.3.2.3 صبغة النكروسين Nigrosin :

حُضرت الصبغة وفق (Atlas *et al.*,1995) كما يأتي:

أذيب 7 غم من النكروسين في 100 مليلتر من الماء المقطر ووضع في حمام مائي مغلي ثم برد المحلول وأضيف اليه 0.5 مليلتر من الفورمالين ورشح خلال طبقتين من ورق الترشيح Whattman's filter paper No.1.

4.2.3 الأوساط الزرعية Culture media :

حُضرت الأوساط الزرعية حسب تعليمات الشركة المصنعة والمثبتة على العبوات وضبط الآس الهيدروجيني الى 7 ثم عقمت بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 مْ وضغط 15 باوند/انج^2 لمدة 15 دقيقة، ومن ثم حضنت الأطباق في درجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة للتأكد من عدم تلوثها وحُفظت في درجة حرارة 4 مْ لحين الأستعمال، فيما حضرت الأوساط التالية كما يأتي:-

1.4.2.3 وسط أكار الدم Blood Base agar:

حُضر هذا الوسط بإضافة دم الإنسان صنف AB بنسبة 5% الى وسط أكار الدم الأساس المحضر وفق تعليمات الشركة والمعقم بعد تبريده الى درجة حرارة 50 مْ ثم صب في أطباق معقمة وترك ليتصلب (Forbes *et al.*, 2002) .

2.4.2.3 وسط أكار اليوريا Urea base agar:

حضر حسب تعليمات الشركة المنتجة والمثبته على العبوة وذلك بإذابة 40 غم من مسحوق اليوريا في 100 مل من الماء المقطر للحصول على تركيز نهائي 40% وعقم المحلول بالترشيح بوساطة المرشحات الدقيقة وحفظ في درجة حرارة 4 مْ. تم أخذ 5 مل من محلول اليوريا الى 95 مل من وسط آكار اليوريا الاساس المعقم والمبرد لدرجة 45مْ وزع الوسط الزرعي على انابيب معقمة بمقدار 5 مل لكل انبوبة، وتركت لتبرد بشكل مائل للحصول على سطح مائل (Slant) وحفظت في درجة حرارة 4مْ لحين الاستعمال (MacFaddin,1979) .

3.4.2.3 وسط نقيع القلب والدماغ السائل :

حضر حسب تعليمات الشركة المجهزة وعقم بالموصدة عند درجة حرارة 121 مْ وضغط 15 باوند/ انج^2 لمدة 15 دقيقة.

4.4.2.3 وسط نقيع القلب والدماغ الصلب:

حضر حسب تعليمات الشركة المجهزة وعقم بالموصدة عند درجة حرارة 121مْ وضغط 15 باوند/ انج^2 لمدة 15 دقيقة.

5.4.2.3 وسط الاقتران البكتيري (Luria Bertonia medium): حسب ماجاء في (Maniatis *et al.*,1982)

حضر الوسط بإذابة 1 غم من الببتون مع 0.5 غم من مستخلص الخميرة و0.5 غم من كلوريد الصوديوم في 100 مل من الماء المقطر، عقم بالمؤصدة بعد ضبط الاس الهيدروجيني الى 7.

6.4.2.3 وسط المثيل الأحمر – فوكس بروسكاور السائل MR–VP Broth :

حُضر وفقا لما ورد في .(Harley and Prescott ,1996) وذلك بإذابة 7 غم من الببتون و5 غم من فوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين و 5 غم من دكستروز في1 لتر من الماء المقطر, ثم عقم بالموصدة بعد ضبط الاس الهيدروجيني عند 7.

7.4.2.3 وسط الحركة:

حُضر وفقا لما ورد في .(Harley and Prescott ,1996) وذلك بأذابة 10 غم من تربتون و5غرام من كلوريد الصديوم و 5 غرام اكار–اكار في 1لتر من الماء المقطر، ثم عقم بالموصدة بعد ضبط الاس الهيدروجيني عند 7.2 .

8.4.2.3 وسط احمر الكونكو المتصلب بمادة الأكار Congo– red agar :

أُذيب 37 غم من وسط المرق المغذي Brain – Heart Infusion Broth و 50 غم سكروز و 10 غم من وسط أكار أكار في 900 مل من الماء المقطر, وعُقم الوسط بالمؤصدة،

أما صبغة الكونكو ريد فقد أُذيب 0.8 غم منها في 100 مل من الماء المقطر وعُقمت بالمؤصدة، وبعدها أُضيفت الى الوسط بعد تبريده الى 55 مْ وصبت في أطباق معقمة، هذا الوسط يستخدم للكشف عن قابلية البكتريا في إنتاج الطبقة المخاطية (Slime Layer)، (Freeman *et al.*, 1989) .

9.4.2.3 وسط سيانيد البوتاسيوم (KCN):

أُذيب 3 غم من البيبتون و5 غم من كلوريد الصوديوم و0.23 غم من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين و5.64 غم من فوسفات الصوديوم احادية الهيدروجين المائية بالماء المقطر وعقم الوسط بدرجة حرارة 121مْ لمدة 15 دقيقة وأضيف 15 مل من محلول سيانيد البوتاسيوم 0.5 % الى 1 لتر من الوسط الأساس المعقم ثم وزع في أنابيب معقمة (Collee *et al.*,1996).

10.4.2.3 وسط تربتيكيز صويا أكار (TSA)Trypticase Soy Agar:

حُضر هذا الوسط بأذابة 19 غم من TSA في 500 مل من الماء المقطر حسب تعليمات الشركة المصنعة، وأُضيفت أليه 3% من خلاصة الخميرة وعقم بالمؤصدة، أستخدم هذا الوسط للتحري عن قابلية البكتريا لأنتاج البكتريوسين (القصاب والخفاجي 1992)

11.4.2.3 وسط أنزيم تميع الجيلاتين:

حُضر الوسط بإذابة 12 غم من الجلاتين في 100 مليلتر من المرق المغذي المحضر حسب تعليمات الشركة المجهزة، وبعدها وزع في أنابيب زجاجية بواقع 5 مليلتر لكل انبوب. ثم عُقم بالمؤصدة وحفظ في الثلاجة لحين الأستعمال.

12.4.2.3 وسط حفظ العزلات (حفظ طويل الأمد 8 – 12 شهر):

حُضر الوسط بإضافة 15 مل من الكليسرول إلى 85 مل من نقيع الدماغ والقلب، ووزع في قناني صغيرة ذات غطاء محكم وعقم بالموصدة،ترك ليبرد في درجة حرارة الغرفة، ثم لقح بمستعمرات نقية من البكتريا النامية على الوسط الاكار المغذي باستخدام الناقل (Loop)،

وحفظت القناني في درجة حرارة 20- مْ بعد حضانتها لمدة 24 ساعة في درجة حرارة 37مْ استخدمت هذه الطريقة في الحفظ الدائم (Ausubel *el al.*, 1987) .

13.4.2.3 وسط إدامة العزلات البكتيرية (حفظ متوسط الأمد 4 أشهر):

لقحت الانابيب الحاوية على وسط الآكار المغذي المائل بالعزلات البكتيرية ثم حضنت في درجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة بعدها حفظت في درجة حرارة 4 مْ لحين الاستخدام، وتمت عملية ادامة العزلات بشكل دوري شهرياً وذلك بتنشيطها على الوسط المغذي السائل، ثم اعادة زراعتها على وسط مائل جديد لضمان بقاء العزلات بشكل نشط طيلة مدة الدراسة.

3.3 جمع العينات :

تم جمع 206 عينة من حالات مرضية مختلفة وتضمنت 56 عينة من مسحات الحروق، 70 عينة من مسحات الجروح، 57 عينة من القشع و23 عينة من الأدرار، تم جمع العينات من مراجعي مستشفى بعقوبة التعليمي، والعيادة الأستشارية الخارجية، ومستشفى الطوارئ الجراحية في بعقوبة، للفترة الواقعة بين (2011/9/15 – ولغاية 2012/1/12). زرعت العينات على وسطي أكار الدم وأكار المكونكي، وحضنت بدرجت حرارة 37 مْ ولمدة 18- 24 ساعة. تم تشخيص المستعمرات مظهرياً وتم التركيز على المستعمرات المخمرة لسكر اللاكتوز المخاطية على وسط المكونكي ثم نقلت الى وسط EMB الصلب لتفريق الـ *Klebsiella* عن بكتريا الـ *E.coli* ذات البريق المعدني .

4.3 تشخيص العزلات البكتيرية :

1.4.3 التشخيص المظهري :

شخصت العزلات البكتيرية من خلال دراسة الصفات الزرعية العامة للمستعمرات النامية على وسط أكار المكونكي وأكار الدم، وبعدها تمت دراسة أشكال المستعمرات الظاهرة وحددت على أساس القوام، واللون، والشكل، والحجم، فضلاً عن ملاحظة الصفات العامة الأخرى مثل تخمر اللاكتوز من عدمه، كذلك وجود تحلل للدم على وسط أكار الدم من عدمه (Bergey and John,1994).

2.4.3 الصفات المجهرية :

أجري الفحص المجهري للخلايا البكتيرية من خلال تصبيغها بصبغة كرام المحضرة في الفقرة 2-2-3-1 وفحصت تحت العدسة الزيتية للمجهر الضوئي، ودرست أشكال الخلايا بعد صبغها من خلال تفاعل الخلايا مع الصبغة . وملاحظة شكل الخلية وتجمعها.

3.4.3 الفحوصات الكيموحيوية :

1- اختبار إنتاج أنزيم الاوكسيديز Oxidase test :

نقلت مستعمرة واحدة نقية منماة على وسط الاكار المغذي بعمر 18-24 ساعة الى ورقة ترشيح مبللة مسبقاً بكاشف أنزيم الاوكسيديز، بوساطة عيدان خشبية معقمة. ان تحول لون المستعمرة الى اللون البنفسجي الغامق مباشرة دليل على إيجابية الاختبار (Baron *et al*., 1999).

2- اختبار إنتاج أنزيم الكاتاليز Catalase test :

أستخدم هذا الأختبار للكشف عن قدرة البكتريا على أنتاج أنزيم الكاتاليز الذي يحلل بيروكسيد الهيدروجين الى ماء ويتحرر غاز الأوكسجين بشكل فقاعات هوائية إذ نقل جزء من النمو البكتيري بوساطة عيدان خشبية معقمة على شريحة زجاجية، وأضيف إليها قطرة من كاشف بيروكسيد الهيدروجين، ان ظهور الفقاعات دليل على إيجابية الاختبار (Koneman *et al* ., 1992).

3- اختبار الحركة Motility test :

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط اختبار الحركة، بطريقة الطعن على ان تكون مسافة الطعنة مايقارب (3) سم مع مراعاة عدم دخول الطعنة الى قعر الانبوب، حضنت الانابيب بدرجة 37مْ لمدة 24 ساعة. ان ظهور تضبب حول الطعنة دل على ايجابية الاختبار، اي أن البكتريا لها القابلية على الحركة.

4- اختبار الاندول Indol test:

أستخدم للكشف عن وجود الأندول الذي يعد أحد نواتج ايض الحامض الأميني التربتوفان نتيجة لأمتلاك البكتريا لأنزيم التربتوفانيز (Tryptophanase) إذ لقح وسط ماء الببتون السائل, بمستعمرة مفردة من العزلة المراد تشخيصها. حضنت الانابيب بدرجة 37مْ لمدة 24 ساعة. أضيف بعدها 5 قطرات من كاشف Kovac's reagent. ان تكوّن الحلقة الحمراء يدل على إيجابية الاختبار (Bergey and John,1994).

5- اختبار احمر المثيل Methyl red test :

أستخدم هذا الأختبار للكشف عن قدرة البكتريا على أنتاج حامض اللاكتيك أو حامض الفورميك نتيجة ايض الكلوكوز، إذ لقحت الأنابيب الحاوية على وسط MR-VP ، وحضنت الانابيب بدرجة 37مْ لمدة 48-72 ساعة ، وبعد انتهاء مدة الحضانة أضيف كاشف أحمر المثيل. تغير لون الوسط الى الأحمر دل على إيجابية الاختبار (Bergey and John,1994).

6- اختبار الفوكس بروسكور Voges-Proskauer test

أستخدم هذا الأختبار للكشف عن قدرة البكتريا على أنتاج استيل مثيل كاربينول (اسيتون) إذ لقحت الانابيب الحاوية على وسط MR-VP، وحضنت الانابيب بدرجة 37مْ لمدة 48-72 ساعة، نقل 1 مل من العالق الى أنبوبة أختبار نظيفة أُضيف إليها 0.6 مل من محلول ألفا نفثول (كاشف VP1) متبوعاً 0.2 مل من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم 40% (كاشف VP2) مع رج الأنبوبة بلطف، تعد النتيجة موجبة عند ظهور اللون الأحمر بعد حوالي 15 دقيقة (Bergey and John,1994)

7- اختبار استهلاك السترات Citrate utilization test :

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط سترات سايمون المائل بالتخطيط، حضنت بدرجة 37مْ ولمدة 24 ساعة. لوحظ تحول لون الوسط من الأخضر الى الازرق في العزلات الموجبة

المستهلكة للسترات بوصفه مصدراً كاربونياً وحيداً، وبقاء اللون الاخضر في السالبة منها (Bergey and John,1994).

8- اختبار إنتاج أنزيم اليوريز Urease test:

لقحت الانابيب الحاوية على وسط اكار اليوريا بطريقة التخطيط على المائل ثم حضنت بدرجة 37مْ لمدة 24 ساعة. دل تحول لون الوسط الى الوردي على إيجابية الاختبار(Collee *et al.*,1996).

9- أختبار النمو في وسط سيانيد البوتاسيوم KCN growth:

لُقح الوسط المحضر في الفقرة 2-2-4-7 وحضن بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 48 ساعة، ظهور العكورة دليل على إيجابية الأختبار (Collee *et al.*,1996).

10- أختبار أنزيم تميع الجيلاتين Gelatinase Laquification test:

لقحت أنابيب وسط الجيلاتين المحضر في الفقرة 3-2-4-11 بالعزلات المراد تشخيصها ثم حضنت بدرجة 37مْ لمدة 2-72 ساعة، وضعت بعدها الانابيب في الثلاجة لمدة 30 دقيقة، اذ يدل تصلب الوسط بعد وضعه في الثلاجة على أنّ العزلات سالبة للفحص.

4.4.3 تشخيص البكتريا بأستخدام عدة التشخيص API 20 E Kit :

أُتبعت الطريقة المبينة من الشركة المجهزة للعدة التشخيصية (biomerieux) ولجميع العزلات كما يأتي:

- تحضير الشريط Preparation of the Strip:

تم وضع 5 ملليترات من الماء في الحفر (Wells) الموجودة في حاوية الشريط (Tray) لجعل الظروف رطبة ثم وضع الشريط داخل الحاوية.

- تحضير اللقاح البكتيري Preparation of bacterial inoculum:

نُقلت مستعمرة مفردة نقية نامية في وسط أكار ماكونكي الى أنبوبة أختبارحاوية 5 مليلتر من محلول الملح الفسلجي المحضر في الفقرة 2-2-1-1 وبعد المزج الجيد بأستعمال المازج قُورنت عكورته بعكورة أنبوبة مكفرلاند 0.5 المحضر في الفقرة 2-2-1-2.

- تلقيح الشرائط Inoculation of the Strips:

بأستعمال ماصة باستور معقمة أُضيف العالق البكتيري على حافة الأنبوب الموجود على الشرائط وملىء (مع تجنب حدوث فقاعات في أثناء الأضافة) الجزء السفلي (Tube) والجزء العلوي (Cupule) منه، بالنسبة لأختبارات السترات والفوكس بروسكور والجلاتين (GEL,VP,CIT) أما بقية الأنابيب فملىء الجزء السفلي (الأنبوب فقط) وأضيف الزيت (Mineral Oil) في الجزء العلوي بالنسبة لأختبارات الأرجنين واللايسين والأورنثين وأنتاج كبريتيد الهيدروجين واليورياز (ADH,LDC,ODC,H2S,URE) أغلقت الحاوية بالغطاء (Lid) الخاصة بها وحضنت بدرجة 37 مْ ولمدة 18-24 ساعة .

- قراءة النتائج :

بعد أنتهاء مدة الحضن أُضيفت الكواشف المجهزة مع العدة التشخيصية وكما يأتي:

أ- قطرة من كاشف الأندول (JAMES) الى أنبوب الأندول (IND) وقرأت النتيجة مباشرة.

ب- قطرة من كاشف من 10% كلوريد الحديديك الى أنبوب التربتوفان دي اميناز TDA وقرأت النتيجة مباشرة .

جـ - قطرة من كاشف (VP1) من (40% هيدروكسيد البوتاسيوم) ثم قطرة من كاشف (VP2) (6% ألفا – نفثول) الى أنبوب (VP) وقرأت النتيجة خلال دقائق حسب الجدول (3-1).

الجدول (3-1) الأختبارات الكيموحيوية بأستعمال نظام APi 20 E :

الأختبار	الرمز	النتيجة السالبة	النتيجة الموجبة
1-أنتاج أنزيم بيتا الكتوسايديز	ONPG	عديم اللون	أصفر
2-تحلل الأرجنين	ADH	أصفر	أحمر/ برتقالي
3-تحلل اللايسين	LDC	أصفر	أحمر/ برتقالي
4-الأورنيثين	ODC	أصفر	أحمر/ برتقالي
5-أستهلاك السترات	CIT	أصفر	أخضر/ أزرق
6-أنتاج غاز كبريتيد الهيدروجين	H2S	عديم اللون	راسب اسود
7-أنتاج أنزيم اليوريز	URE	أصفر	أحمر/ برتقالي
8-أنتاج أنزيم تربتوفانديامنيز	TDA	أصفر	بني غامق
9-أنتاج الأندول	IND	حلقة صفراء	حلقة حمراء
10-أنتاج الأسيتون	VP	عديم اللون	وردي/ أحمر
11-أنتاج أنزيم محلل الجلاتين	GEL	عدم أنتشار الصبغة	أنتشار صبغة سوداء
12-تخمر سكر الكلوكوز	GLU	أزرق	أصفر
13-تخمر المانيتول	MAN	أزرق	أصفر
14-تخمر الإينوسيتول	INO	أزرق	أصفر
15-تخمر السوربيتول	SOR	أزرق	أصفر
16-تخمر الراميتوز	RHA	أزرق	أصفر
17-تخمر السكروز	SAC	أزرق	أصفر
18-ميليبايوز	MEL	أزرق	أصفر
19-أمكدالين	AMY	أزرق	أصفر
20-الأرابينوز	ARA	أزرق	أصفر

5.4.3 تشخيص البكتريا بنظام VITEK 2 :

استعمل هذا الجهاز المجهز من شركة (Bio Merieux) بتشخيص البكتريا بدرجة عالية جدا من الدقة اذ يتضمن هذا الجهاز 64 اختبارا من الاختبارات الكيموحيوية التي تستعمل في تشخيص البكتريا بحيث تصل درجة دقة التشخيص بهذا الجهاز إلى 98% كذلك يمكن إجراء فحص الحساسية لمضادات الحيوية بهذا الجهاز.

المواد المستعملة

1- VITEK 2 Cassette
2- محلول ملحي معقم محضر في فقرة (3-2-1-8)
3- أوساط زرعية (وسط ماكونكي و وسط نقيع القلب ووسط الاكار المغذي)
4- قطعة بلاستيكية تسمى(Polystyrene) لغرض حمل الأنابيب
5 - VITEK 2 GN Card
6 - VITEK 2 DENSICHEK
7 - Vortex
8 - مسحة معقمة
9 - VITEK 2 DENSICHEK Power Adapter

طريقة العمل

1- زرعت البكتريا المراد فحصها على وسط اكار الماكونكي او الاكار المغذي وحضنت مدة 24 ساعة وبدرجة 37 مْ وبطريقه التخطيط .

2- اجري فحص صبغة غرام للعينة لغرض اختيار VITEK 2 Cassette المناسب.

3 -تم انتقاء مستعمرة مفردة نقية من البكتريا وتخفيفها في 3 مليلتر من المحلول الملحي الموضوع في أنبوبة معقمة ومحمولة بحامل خاص.

4- قيست عكورة المستعمرة بجهاز VITEK 2 DENSICHEK بحيث تكون العكورة 0.5 – 0.63 .

5- وضع العالق الموجود في الانبوبة في VITEK 2 Cassette الخاص بالبكتريا السالبة لصبغة غرام.

6- ثم نقل VITEK 2 Cassette إلى الجهاز لغرض تشخيص البكتريا عن طريق 64 فحصا كيموحيويا (جدول 3-2).

7- ظهرت النتيجة بعد 24 ساعة من وضع العينة في الجهاز، (جدول 3-2).

الجدول (3-2) الفحوصات الكيموحيوية التي يقوم بها جهاز VITEK

رقم الحفرة	اسم الاختبار	المختصر	تركيز المركب
2	Ala –Phe-Pro-ARYLAMIDASE	APPA	0.0384 MG
3	ADONITOL	ADO	0.1875 mg
4	L-Pyrrolydonyl –ARYLAMIDASE	PyrA	0.018 mg
5	L-ARABITOL	IARL	0.3 mg
7	D-CELLOBIOSE	dCEL	0.3 mg
9	BETA –GALACTOSIDASE	BGAL	0.036 mg
10	H2S PRODUCTION	H2S	0.0024 mg
11	BETA -N –ACETYL -GLUCOSAMINDASE	BNAG	0.0408 mg
12	Glutamyl Arylamidase pNA	AGLTp	0.0324 mg
13	D-GLUCOSE	Dglu	0.3 mg
14	GAMMA -GLUTAMYL -TRANSFERASE	GGT	0.0223 mg
15	FERMENTATION /GLUCOSE	OFF	0.45 mg
17	BETA -GLUCOSIDASE	BGLU	0.036 mg
18	D –MALTOSE	dMAL	0.3 mg
19	D-MANNITOL	Dman	0.1875 mg
20	D-MANNOSE	Dmne	0.3 mg
21	BETA –XYLOSIDASE	BXYL	0.0324 mg
22	BETA-Alanine aryamidase Pna	BAlap	0.0174 mg
23	L-Proline ARYLAMIDASE	ProA	0.0234 mg
26	LIPASE	LIP	0.0192 mg
27	PALATINOSE	PLE	0.3 mg
29	Tyrosine ARYLAMIDASE	TyrA	0.0276 mg
31	UREASE	URE	0.15 mg
32	D-SORBITOL	dSOR	0.1875 mg
33	SACCHAROSE /SUCROSE	SAC	0.3 mg
34	D-TAGATOSE	dTAG	0.3 mg
35	D-TREHALOSE	dTRE	0.3 mg
36	CITRATE (SODIUM)	GIT	0.054 mg
37	MALONATE	MNT	0.15 mg
39	5-KETO –D –GLUCONATE	5RG	0.3 mg
40	L-LACTATE alkalipisation	ILATK	0.15 mg

0.036 mg	AGLU	ALPHA –GLUCOSIDASE	41
0.15 mg	SUCT	SUCCINATE alkalipisation	42
0.0306 mg	NAGA	Beta –N-ACETYL –GALACTOSAMINIDASE	43
0.036 mg	AGAL	ALPHA-GALACTOSIDASE	44
0.0504 mg	PHOS	PHOSPHATASE	45
0.012 mg	GlyA	Glycine ARYLAMIDASE	46
0.3 mg	ODC	ORNITHINE DECARBOXYLASE	47
0.15 mg	LDC	LYSINE DECARBOXYLASE	48
NA	ODEC	DECARBOXYLASE BASE	52
0.087 mg	IHISa	L-HISTIDINE assimilation	53
0.126 mg	CMT	COURMARATE	56
0.0378 mg	BGUR	BETA –GLUCORONIDASE	57
0.0105 mg	O129 R	O/129 RESISTANCE (comp. vibrio.)	58
0.0576 mg	GGAA	GLU-GLY-Arg-ARYLAMIDASE	59
0.042 mg	IMLTa	L-MALATE assimilation	61
0.03 mg	ELLM	ELLMAN	62
0.186 mg	ILATa	L-LACTATE assimilation	64

5.3 التحري عن بعض عوامل الضراوة في بكتريا *Klebseilla pneumonia*

1.5.3 التحري عن وجود المحفظة (Capsul):

استخدمت طريقة التصبيغ السالب (Negative staining) وحسب ماجاء في Atlas (*et al.*,1995).

مزجت كمية صغيرة من النمو البكتيري المأخوذ من مستعمرة عمرها 24 ساعة مع قطرة من صبغة النكروسين فقرة 3–2–3–2 بعود خشبي (Stick). نشرت على شريحة بعمل مسحة بحافة شريحة زجاجية أخرى، وتركت الشريحة تجف في الهواء، وفحصت تحت المجهر. تظهر المحفظة بشكل هالة بيضاء (غير مصطبغة) محيطة بالخلية البكتيرية في حال كون البكتريا مكونة لها.

2.5.3 اختبار الانزيم الحال للدم Haemolysin test :

زرعت العزلات البكتيرية المراد اختبار قابليتها على إنتاج انزيم الهيمولايسين على وسط اكار الدم فقرة 3-2-4-1، ثم حضنت بدرجة 37 مْ مدة 24 ساعة. دلّ ظهور منطقة تحلل شفافة تحت وحول المستعمرات على النتيجة الموجبة للاختبار (Atlas *et al.,* 1995).

3.5.3 التحري عن أنزيم اليوريز Urease test:

لُقح وسط اليوريا المحضر في الفقرة 3-2-4-2 بالمزروع البكتيري ثم حضن بدرجة 37مْ لمدة 24-48 ساعة أن تحول لون الوسط الى اللون الوردي دليل على إيجابية الأختبار (Atlas *et al.*, 1995).

4.5.3 التحري عن قابلية البكتريا على إنتاج البكتريوسين Bacteriocin :

أُستخدمت طريقة اقراص الاكار Cup disc: حسب الطريقة المذكورة في (القصاب والخفاجي، 1992) وكالآتي:

زرعت البكتريا المنماة مسبقا في وسط مرق نقيع القلب والدماغ وبعمر 24 ساعة بطريقة النشر على وسط اكار TSA المحضر في الفقرة 3-2-4-10، ثم حضنت الاطباق في درجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة. وبعد الحضن عملت اقراص في هذا الوسط ووضعت على سطح الاكار المغذي والمنشور عليه بالناشرمقدار 0.1 مل من مزروع كل من عزلات الاختبار البكتيرية المذكورة بعد ان ثبت عدد الخلايا المزروعة بمقدار 8^{10} خلية / مليلتر بعد مقارنتها مع محلول ماكفرلاند القياسي المحضر ثم حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24 ساعة، بعدها قيس قطر منطقة التثبيط حول الاقراص .

5.5.3 طريقة احمر الكونكو Congo-red method للتحري عن قابلية البكتريا في إنتاج الطبقة المخاطية Slime layer and Biofilm formation:

نُقلت مستعمرة مفردة نقية نامية على وسط أكار المكونكي الى أنبوبة أختبار حاوية على 5 مليلتر من محلول الملح الفسلجي المحضر في الفقرة 1.1.2.3 وبعد المزج الجيد بأستعمال المازج قُرنت عكورته بعكورة أنبوبة Macfarland No. 0.5 المحضر في الفقرة

2.1.2.3 ولُقح وسط الكونكو ريد المحضر في الفقرة 8.4.2.2 وحُضنت الأطباق في درجة حرارة 37مْ لمدة 24–48 ساعة، النتيجة الموجبة حينما تظهر المستعمرات سوداء اللون مع كثافة بلورية جافة، أما النتيجة السالبة فتبقى المستعمرات وردية اللون، أما النتيجة غير المحددة فتظهر المستعمرات سوداء اللون بدون وجود الكثافة البلورية الجافة (Freeman *et al* .,1989; Mathur *et al* .,2006).

6.3 فحص الحساسية للمضادات الحيوية Antibiotic sucepitipility test:

أُستخدمت طريقة Bauer and Kerby القياسية لأختبار حساسية البكتريا للمضادات الحيوية (Vandepitte et al.,1991) وكالأتي:

- لُقح 5 مل من وسط المرق المغذي بـ 2–3 مستعمرات من مزارع بكتيرية نقية بعمر 24 ساعة .
- رُجت الأنابيب جيداً وحضنت بالحاضنة بـ 37مْ لمدة 24 ساعة .
- قُورنت عكورة النمو بعكورة المحلول ثابت العكرة القياسي لأعطاء عدد تقريبي مساوٍ $1.5x10^8$ خلية/ مل .
- نُقل 0.1 مل من العالق البكتيري، ونُشر على وسط أكار مولر هنتون، تُرك الطبق لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة الغرفة لحين جفاف المزروع .
- نُقلت أقراص المضادات الحيوية الى سطح الوسط الزرعي بوساطة ملقط معقم بمعدل 6–7 أقراص لكل طبق .
- حُضنت الأطباق بدرجة 37مْ لمدة 18–24 ساعة قُيست بعدها أقطار مناطق التثبيط حول كل قرص، عُدت البكتريا حساسة (S) أو مقاومة (R) أو متوسطة (I) حسب المواصفات القياسية الواردة في NCCLS (2007) .

7.3 التحري عن إنتاج أنزيم البيتالاكتاميز β-Lastamase production :

1.7.3 تحضير العالق البكتيري :

لُقحت أنابيب أختبار تحوي كل منها على 5 مل من محلول الملح الفسلجي بـ 150 مايكروليتر من مزارع بكتيرية منماة في وسط نقيع الدماغ والقلب بعمر 18 ساعة للعزلات قيد الدراسة، مُزجت بمازج وبذلك تم تحضير عالق بكتيري بتركيز تقيريبي للخلايا 10^8 خلية/ مل، وذلك بعد مقارنة عكورة النمو المتكون مع عكورة محلول ثابت العكورة القياسي المحضر في الفقرة 2.1.2.3.

2.7.3 أستخدام طريقة اليود القياسية السريعة (Rapid Iodometric):

حسب ما ورد في (WHO,1978) للتحري عن قابلية العزلات قيد الدراسة على إنتاج أنزيم البيتا لاكتاميز كما يأتي :

- حُضرت مزارع للعزلات البكترية بعمر 24 ساعة.
- نُقلت المستعمرات البكتيرية بوساطة العروة الى أنابيب ابندروف الحاوية على 100 مايكروليتر من البنسللين ج حسب فقرة 3.5.1.2.2 وحُضنت الأنابيب لمدة 30 دقيقة عند درجة حرارة 37 مْ .
- أُضيفت الى كل أنبوبة 50 مايكروليتر من محلول النشأ فقرة 3-2-1-5-1 ومُزج جيدا مع محتويات الأنبوبة .
- أُضيف 20 مايكروليتر من محلول اليود فقرة 3-2-1-5-2 حيث تحول لون المحلول الى أزرق غامق نتيجة تفاعل اليود مع النشأ، مُزجت محتويات الأنابيب جيدا لمدة 1 دقيقة .
- أُحتسبت النتيجة موجبة عند حصول تغير لوني سريع من الأزرق الى الأبيض خلال دقيقة واحدة فقط من أضافة الكاشف (اليود) .
- أُعيد الفحص بظهور نتيجة موجبة متأخرة (أكثر من 5 دقائق).

8.3 التحري عن أنزيمات البيتا لاكتاميز واسعة الطيف (ESβLs) Extended β- Lactamase:

أُستخدمت طريقة الأقراص المتاخمة Disc approximation للتحري عن أنزيمات البيتا لاكتاميز واسعة الطيف وذلك حسب ما جاء في (Jarlier *et al.*,1988) وكالأتي:

1- حُضر العالق البكتيري للعزلات قيد الدراسة وفق الفقرة 2-7-1 ونشر المزروع بوساطة المسحة القطنية Swab المعقمة على أطباق حاوية على وسط مولر هنتون بصورة كاملة، وتركت الأطباق لمدة 10 دقائق لتجف .

2- وُضع قرص يحتوي على خليط من الـ (Amoxicillin/Clavulanic acid 30µg/Disk) في وسط الطبق الزرعي الملقح، ثم رُتبت أقراص المضادات الحيوية،Cefotaxime ، Ceftazidim, Pipracillin على بعد 3 سم من مركز قرص خليط المضاد/ المثبط .

3- حُضنت الأطباق عند درجة حرارة 37 مْ ولمدة 18-24 ساعة.

4- بعد ملاحظة مناطق التثبيط فإن حدوث أتساع في منطقة التثبيط بين القرص المركزي وواحد أو أكثر من الأقراص المذكورة دليل على النتيجة الموجة أي أنتاج العزلة للأنزيم .

9.3 التحري عن قابلية البكتريا لإنتاج أنزيمات البيتا لاكتاميز المعدنية Metallo beta lactamase – بأستخدام طريقة أتحاد المضاد الحيوي Imipenem (IPM)-EDTA:

1- حُضر العالق البكتيري للعزلات قيد الدراسة وفق الفقرة 1.7.3 ونشر المزروع بوساطة المسحة القطنية Swab المعقمة على أطباق حاوية على وسط مولر هنتون بصورة كاملة، وتركت الأطباق لمدة 10 دقائق لتجف .

2- وضع قرصين من المضاد الحيوي Imipenem (10µg) في وسط الطبق الزرعي الملقح على أن تكون المسافة بينهما 3 سم .

3- تم وضع 10 مايكروليتر من محلول EDTA المحضر في الفقرة 9.1.2.3 الى واحد من أقراص الـ Imipenem .

4- حُضنت الأطباق عند درجة حرارة 37 مْ لمدة 16-18 ساعة .

5- بعد ملاحظة مناطق التثبيط فأن زيادة منطقة التثبيط على 7 مليمتر حول قرص ال Imipenem مع EDTA مقارنة مع قرص Imipenem لوحده تعد النتيجة موجبة وأن البكتريا تعد منتجة لأنزيم الميتالو بيتالاكتاميز Metallo-beta lactamase MBL (Bhalerao, *et al.*,2010).

10.3 تحديد العزلات المقاومة للمعادن الثقيلة:

* اتبعت طريقة التخافيف المتضاعفة بالاكار (Two fold dilution) لتحديد حساسية العزلات قيد الدراسة لـ 5 معادن ثقيلة شملت املاح (النحاس، الكوبلت، الزنك، الزئبق، الفضة). حضرت تراكيز مختلفة من أملاح المعادن الثقيلة تراوحت بين 0.005 ملي مول الى 4.5 ملي مول لكل معدن وفق ماشار اليه (Bhattacherjee *et al.*, 1988).

* أضيفت نسب مختلفة من هذه المعادن الثقيلة من محاليلها الخزينة المحضرة في الفقرة 4.1.2.3 الى وسط مولر هنتون المعقم والمبرد الى 50 مْ ثم صب الوسط في أطباق معقمة وترك ليتصلب في درجة حرارة الغرفة.

* حُضر العالق البكتيري للعزلات قيد الدراسة وفق الفقرة 1.7.3، تم سحب5 مايكروليتر من العالق البكتيري بوساطة ماصة دقيقة ولقحت كقطرة واحدة على أوساط المعادن الثقيلة.

* كررت العملية للمزارع كافة بالتسلسل مكررين للتركيز الواحد، وتركت الأطباق لفترة في درجة حرارة الغرفة لحين جفاف القطرات قبل قلب الأطباق .

* حُضنت الأطباق عند درجة حرارة 37 مْ لمدة 18-24 ساعة .

* قرأت النتائج لتحديد قيمة التراكيز المثبطة الدنيا للمعادن الثقيلة.

حسبت قيمة الـMIC على انه اقل تركيز من المعدن الثقيل الذي منع ظهور نمو واضح.

11.3 قياس التركيز المثبط الأدنىMinimal Inhibitory Concentration :

أُستخدمت طريقة التخافيف المضاعفة المتسلسلة لحساب التركيز المثبط الأدنى لعدد من المضادات الحياتية أعتماداً على ما ورد في Stock and Ridg way 1987 وكما يلي:

- حُضرت تراكيز متسلسلة متضاعفة تراوحت بين 0.5-1024 مكغم/ مل لكل من المضادات الحيوية الآتية:

Augmentin, Ampicillin, Piperacillin, Cephalexin, Cefotaxzime, Imipenem, Trimethoprime, Amikacin, Carbencillin, Chloramphenicol, Ciprofloxacin Aztreonam, بأضافة نسب مختلفة من هذه المضادات من محاليلها الخزينة فقرة 3-2-1-3 الى وسط أكار مولر هنتون المعقم والمبرد الى 45 مْ .

- حُضرت التخافيف العشرية وأختير التخفيف 10^{-2} لمزارع البكتريا بعمر 24 ساعة بأستعمال المحلول الفسلجي المعقم المحضر في الفقرة 3-2-1-1.

- سحب 5 مايكرو ليتر من التخفيف أعلاه بوساطة ماصة دقيقة كل على حدة، ولقحت كقطرة واحدة على أوساط المضادات.

- كررت العملية للمزارع كافة بالتسلسل مكررين للتركيز الواحد وتركت الأطباق لفترة في درجة حرارة الغرفة لحين جفاف القطرات قبل قلب الأطباق و حُضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة .

- أحتسب تركيز المثبط الأدنى بأنه أقل تركيز يمنع ظهور النمو البكتيري بعد حضانة 18-24 ساعة بدرجة حرارة 37 مْ .

تم مقارنة النتائج مع نقطة التوقف Break Point ويمثل أقل تركيز يمكن أن يصله المضاد في المصل ليعطى أعلى فعالية .

12.3 أستخلاص الدنا البلازميدي:

تم أستخلاص الدنا البلازميدي بإتباع الخطوات الآتية إعتماداً على تعليمات الشركة المجهزة (Promega U.S.A):

1- نقل 600 مايكروليتر من المزروع البكتيري بعمر 18 ساعة الى أنبوبة ابندروف 1,5 مل.

2- أضيف 100 مايكروليتر من الدارىء المحلل للخلايا, ومزج الخليط عن طريق قلب الأنبوبة 6 مرات .

3- أضيف 350 مايكروليتر من محلول التعادل المبرد 4 - 8 مْ cold Neutralization Solution ومزجت المحتويات بالقلب مرات عدة.

4- نبذ المزيج بوساطة المنبذة الصغيرة بسرعة 13000 دورة/ الدقيقة لمدة 3 دقائق .

5- نقل الراشح تقريباً 900 مايكروليتر الى عمود التنقية Pure yield minicolumn وأهملت الحبيبة اللزجة المتكونة.

6- وضع عمود التنقية داخل أنبوبة الجمع Collection tube ونبذ المزيج بسرعة 13000 دورة / دقيقة لمدة 15 ثانية.

7- تم أزالة الراسب المتكون في أنبوبة الجمع وأرجاع عمود التنقية داخلها.

8- أضيف 200 مايكروليتر من محلول Endotoxin Removal Wash الى عمود التنقية ونبذ المزيج بسرعة 13000 دورة/ دقيقة لمدة 15 ثانية .

9- اضيف 400 مايكروليتر من محلول Column Wash Solution الى عمود التنقية ونبذ المزيج بسرعة 13000 دورة / دقيقة بالمنبذة الصغيرة لمدة 30 ثانية .

10- نقل عمود التنقية الى أنبوبة أبنديروف سعة 1,5 مل ثم اضيف 30 مايكروليتر من محلول Elution Buffer مباشرة الى أنبوبة عمود التنقية وترك المزيج لمدة 1 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة

11- نبذ المزيج بوساطة المنيذة الصغيرة لمدة 15 ثانية، ثم غلقت أنبوبة أبنديروف الصغيرة بإحكام وحفظ المستخلص بدرجة - 20 مْ وقد اصبح جاهزاً للترحيل الكهربائي .

13.3 الترحيل الكهربائي للدنا البلازميدي في هلام الأكاروز Gel Electrophoresis

أجريت عملية الترحيل الكهربائي لفصل خليط الدنا المستخلص وفحصه:

1-تم إذابة 0.7 غم من الأكاروز في 100 مل من دارىء TBE وترك الهلام ليبرد وتصل حرارته 50 مْ أضيف 5 مايكروليتر من محلول بروميد الايثيديوم بتركيز 5 مكغم/ مل ومزج جيداً.

2-حضر قالب صب الهلام (Tray) وذلك بإحاطة حافتي القالب بالشريط اللاصق وثبت مشط تكوين الحفر (Comb) على بعد 1 سم من أحدى حافتي القالب، ثم صب الهلام داخل القالب الموضوع في وضع أفقي تماماً وترك ليتصلب لمدة 30 دقيقة وفيما بعد رفع المشط والشريط اللاصق برفق ووضع القالب داخل حوض الترحيل الكهربائي المحتوي على دارىء TBE بحيث يغمر هلام الأكاروز .

3-أجريت عملية تحميل عينات الدنا في حفر الهلام بعد مزج 10 مايكروليتر من محلول الدنا مع 3 مايكروليتر من دارىء التحميل (Loading Buffer) .

4-رُحلت كهربائياً تحت فرق جهد 75 فولت وبمعدل مرور للتيار 20 ملي أمبير لمدة 90 دقيقة.

5-تم فحص الهلام بوساطة جهاز UV- Transilluminator بطول موجي مقداره 336 نانوميتر ثم صور بوساطة الكاميرا (Oconnell,1984).

14.3 عملية الاقتران البكتيري :

أجريت عملية الاقتران البكتيري بطريقة O'connel (1984) وفق الخطوات الآتية:

- لقحت مستعمرات مفردة لكل من الخلايا المستلمة المتمثلة بالسلالة القياسية (*E.coli*MM_{294}) المقاومة للريفامبسين والخلايا الواهبة المتمثلة بالعزلات قيد الدراسة بـ5 مليلتر من وسط مرق (LB) في دورق زجاجي حجم 50 مليلتر وحضنت بعد ذلك في حاضنة هزازة بدرجة 37 مْ لمدة 24 ساعة.
- مزج 1 مليلتر من كل من الخلايا الواهبة والمستلمة في أنابيب اختبار معقمة وحضنت بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة من غير تحريك.
- رج المزيج بوساطة المازج الدوّار بشكل جيد لمدة 1–2 دقيقة لفصل الخلايا الواهبة عن المستلمة.
- حضرت سلسلة من تخافيف عشرية للمعلق البكتيري لغاية 10^{-6} نشر 100 مايكروليتر من التخافيف المذكورة على أوساط إنتقائية حاوية على معلمين(2–Markers) هما مضادي الريفامبسين والامبسلين بتركيز نهائي مقداره 100 مايكروغرام/مليلتر لكليهما.
- نشر 100 مايكروليتر من مزيج الاقتران وبتخفيف 10^{-8}، 10^{-7} على أوساط تحوي مضاد الريفامبسين بالتركيز سالف الذكر فقط لحساب عدد الخلايا المستلمة في مزيج الاقتران.
- نشر 100 مايكروليتر من المزارع الاصلية لكل من الخلايا الواهبة والمستلمة على الأوساط الانتقائية اعلاه وحضنت بدرجة 37 مْ لمدة 24 ساعة لحساب عدد الخلايا الطافرة تلقائياً.
- حسب تردد الاقتران من المعادلة الآتية:

$$\text{تردد الاقتران} = \frac{\text{عدد الخلايا الاقترانية (Transconjugant cells)}}{\text{عدد الخلايا المستلمة (Recipient cells)}}$$

15.3 طريقة الأقتران البكتيري في الوسط الصلب حسب طريقة Seldeen 1999:

1 – لُقح 5 مل من وسط مرق L.B بمستعمرة واحدة من الخلايا الواهبة والخلايا المستلمة كلّ على حدة، ثم حُضنت المزارع في حاضنة هزازة بدرجة 37 مْ لمدة 24 ساعة .

2- مُزج 0.5 مل من الخلايا الواهبة مع 0.5 مل من الخلايا المستلمة ثم نشر 0.1 مل من المزيج على سطح اكار Trypticase Soya Agar.

3- حضنت الأطباق بدرجة 37 مْ لمدة 24 ساعة للسماح للخلايا البكتيرية بالأقتران .

4- تم أخذ كمية مناسبة من النمو المختلط بوساطة ناقل معقم وأُعيد تعليقها ثم زُرعت بالتخطيط على وسط يحوي على مضادي الأمبسيلين والريفامبسين وبتركيز نهائي 100 مايكروغرام/ مليلتر لكيليهما.

5-حُضنت الأطباق بدرجة 37 مْ لمدة 24 ساعة لملاحظة نمو الخلايا الإقترانية من عدمه.

16.3: الاقتران البكتيري في الوسط الصلب حسب طريقة Miller 1972:

أجريت عملية الاقتران البكتيري في الوسط الصلب بالاعتماد على الطريقة التي ذكرها Miller (1972) كالاتي:

1. نميت الخلايا الواهبة(*K.pneumoniae*) في احد جهات الطبق الحاوي على وسط نقيع القلب والدماغ الصلب الخالي من أي مضاد وفي الجهة المقابلة نميت البكتريا المستلمة *E. coli* MM294 الخالية من أي بلازميد وفي وسط الطبق مزجت الخلايا المستلمة والواهبة وحضنت عند درجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة.
2. علق مزيج الخلايا الواهبة والمستلمة في محلول التخفيف الفسلجي ثم نشر 0.1 مل منه على الوسط الانتقائي الحاوي على مضادين (الامبسيلين و الريفامبسين بتركيز نهائي 100 مايكرو غرام/ مل ولكل منهما) احدهما المضاد المميز للسلالة المستلمة والأخر مميز للبلازميد المراد نقله لغرض تنمية الخلايا المقترنة فقط وحضنت الأطباق عند درجة حرارة 37 مْ لمدة 24ساعة.

خضعت جميع الخلايا الأقترانية الى إجراء الدراسات التالية :

1.16.3: تم التحري عن المحتوى البلازميدي للخلايا الأقترانية لمعرفة نمط إنتقال البلازميدات من الخلايا الواهبة الى الخلايا المستلمة .

2.16.3: تم التحري عن إنتاج الخلايا الإقترانية لأنزيم البيتا لاكتاميز، وأنزيمات البيتا لاكتاميز الواسعة الطيف، وأنزيمات الميتالوبيتا لاكتاميز .

3.16.3: اختبارات النقل المتزامن للمضادات الحيوية .

4.16.3: اختبارات النقل المتزامن للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة .

17.3 : التحليل الأحصائي بأستخدام نظام SPSS .

الفصل الرابع / النتائج والمناقشة

4. النتائج والمناقشة

1.4 عزل وتشخيص بكتريا *Klebsiella* spp :

1.1.4 الفحص المجهري:

جُمعت 206 عينةٍ بكتيرية تم عزلها من أشخاص مصابين بأخماج مختلفة من كلا الجنسين وبأعمار مختلفة من مستشفيات بعقوبة، وأظهر الفحص المجهري أن 22 عزلة ذات شكل عصوي محاطة بمحفظة، وتوجد بشكل مفرد أو بهيئة أزواج، أو سلاسل قصيرة، ولتمييزها عن الأنواع الباقية أعتمدت الصفات الزرعية ، والإختبارت الكيموحيوية .

2.1.4 الأختبارات الكيموحيوية للبكتريا:

أجريت الأختبارات الكيموحيوية على العزلات المحلية العائدة لجنس *klebsiella spp* وقد شُخصت *K.pneumonia* بالأعتماد على صفاتها المظهرية والمجهرية والأختبارات الكيموحيوية كما في الجدول (4-3).

الجدول (4-3): الأختبارات الكيموحيوية والزرعية والمجهرية لتشخيص بكتريا *K.pneumoniae*

الأختبارات	*K.pneumoniae*
Gram stain	-
Motility test	-
Oxidase test	-
Catalase test	+
Indol production test	-
Methyl red test	-
Voges proskauer test	+
Citrate utilization test	+
H_2S production test	-
Urea hydrolysis (urease test)	+
Gelatin laquification test	-
Lactose fermentation test	+
Growth in KCN media	+

لتأكيد تشخيص العزلات تم إجراء فحص IMVIC وكانت النتائج سالبة لأختبار الاندول وسالبة لأحمر المثيل وموجبة لكل من إختبار الفوكس بروسكاور وإستهلاك السترات .

وبالأعتماد على نتائج الأختبارات المجهرية والزرعية والكيموحيوية، وفقاً لما ورد في المصادر (Kumar *et al.*,2011; Sharmeen *et al.*,2012) إن العزلات هي من نوع *K.pneumoniae* وللتأكد من التشخيص تم إستخدام عدة التشخيص api-20E التي تمتاز بالسهولة والسرعة لتأكيد نتائج التشخيص الكيموحيوي شكل(4-4).

شكل (4-4) : نتيجة تشخيص بكتريا *K.pneumoniae* بنظام Api20NE

3.1.4 تشخيص بكتريا *K.pneumoniae* بجهاز ViTEk2 :

أستعمل جهاز ViTEk2 لغرض تشخيص بكتريا الكليبسيلا ولغرض التأكد النهائي من صحة تشخيص البكتريا بدقة تصل الى 98%، وبعد التشخيص كان عدد عزلات بكتريا *K.pneumoniae* هي 22 عزلة بعد أن كانت 24 عزلة إذ لم يعطِ الجهاز تشخيص عزلتين مشخصة سابقاً بوساطة أشرطة api-20E، فقد تكون المستعمرات غير نقية ملحق (4,5) .

جدول (4-4): الاختبارات الكيموحيوية لتشخيص بكتريا *K.pneumoniae* بوساطة جهاز ViTEk2

نوع الأختبار	النتيجة *K.pneumoniae*	نوع الأختبار	النتيجة *K.pneumoniae*
APPA	-	SAC	+
ADO	+	dTAG	-
PYrA	v	dTRE	+
IARL	+	CIT	+
dCEL	+	MNT	+
BJAL	+	5KG	-
H2S	-	ILATK	+
BNAG	-	AGLU	-
AGLTp	-	SUCT	+
dGLU	+	NAGA	-
GGT	-	AGAL	+
OFF	+	PHOS	+
BGLU	+	GlyA	-
dMAL	+	ODC	+
dMAN	+	LDC	+
dMNE	+	IHISa	-
BXYL	+	CMT	+
BAlap	+	BGLUR	+
ProA	-	O129R	+
LIP	-	GGAA	-
PLE	+	IMLTa	-
TYrA	+	ELLM	-
URE	+	ILATa	-
dSOR	+		

*** + الاختبار موجب 95% _ 100%**

_ الاختبار سالب وقد تصل النسبة إلى 5%

V اختبار متغاير 6% _ 94%

*تعريف المصطلحات موجود في الجدول (3-2)

4.1.4 توزيع العزلات حسب موضع الإصابة :

صُنفت العزلات والبالغ عددها 22 عزلة حسب مواضع الإصابة بعد أن تم تشخيصها بالطرق السالفة الذكر، ويلاحظ من الجدول (4 – 5) إن النسبة الأكبر للعزلات الموجبة كانت ضمن عينات الإدرار (21.7%), أما النسبة الأقل كانت ضمن عينات الجروح (4.3%).

الجدول (4-5): عدد العزلات ونسبها حسب مواقع الإصابة .

نوع العزلة	عدد العزلات	العزلات الموجبة	النسبة المئوية
الإدرار	23	5	%21.7
الحروق	56	10	%17.9
القشع	57	4	%7
الجروح	70	3	%4.3
المجموع	206	22	%10.7

أظهرت النتائج إن عدد عزلات بكتريا *K.pneumoniae* في عينات الإدرار (5 عزلات، وبنسبة 21.7%) وجاءت هذه النتائج متوافقة مع ما توصل إليه الزبيدي (2012) إذ كانت نسبة *K.pneumoniae* في عينات الإدرار (21.8%).

أما بالنسبة لمسحات الحروق فقد بلغت نسبة العزلات قيد الدراسة (17.9%) وكانت مقاربة لنتائج دراسة محلية حديثة أجريت في مستشفى السليمانية للحروق أجراها الباحثان (Qader and Muhamad,2010) إذ بلغت نسبة بكتريا *K.pneumoniae* (15%) وتعد هذه البكتريا اكبر ثاني مسبب لالتهاب الحروق بعد بكتريا *Pseudomonas* للدراسة المشار أليها، وبالنسبة لعينات القشع فقد بلغت نسبة عزلات *K.pneumoniae* قيد الدراسة (7%) وهي مقاربة مع ماتوصل إليه حبيب (2009) إذ أن أعلى نسبة من *K.pneumoniae* كانت في عينات القشع إذ بلغت (12%) .

بالنسبة لعينات الجروح فقد بلغت نسبتها (4.3%) وهي تتفق مع ما توصل إليه حبيب (2009) إذ وجد ان نسبة *K.pneumoniae* في الجروح (4%)، في دراسة محلية أجراها

(AL-Charrakh[b] *et al.*,2011) على عزلات العائلة المعوية كانت عزلات *K.pneumoniae* هي السائدة في عينات الجروح بنسبة (24%) .

2.4 التحري عن عوامل الضراوة Virulence Factors :

شملت الدراسة الحالية التحري عن عدد من عوامل الضراوة المرتبطة بأمراضية بكتريا *K.pneumoniae* .

1.2.4 المحفظة (Capsule) :

لقد تم التحري عن إحتواء العزلات قيد الدراسة على المحفظة بوساطة الفحص المجهري وبأستخدام صبغة النكروسين، إذ ظهرت الخلايا بشكل عصيات محاطة بهالة، وبين الفحص المختبري أن جميع العزلات تحتوي على المحفظة .

لاحظ الباحث *wu et al.,2009* أن النمط المصلي K1 الموجود في محفظة *K.pneumoniae* مسؤول عن الأصابات المكتسبة في المستشفيات بنسبة (14-23.4%) ولاحظ أيضا أن النمط المصلي K1 يمنح صفة البقاء للبكتريا وعلامة مهمة لحدوث مرض خراج الكبد المتسبب عن *K.pneumonia* بنسبة (63.4%).

2.2.4 إنتاج الهيمولايسين (Hemolysin production):

لقد تم التحري على قابلية العزلات قيد الدراسة على إنتاج الهيمولايسين وأظهرت النتائج أن جميع عزلات *K.pneumoniae* ليس لها قابلية على إنتاج الهيمولايسين على وسط أكار الدم .

ويعد الهيمولايسين من عوامل الضراوة المهمة لمجموعة واسعة من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام ويساهم في حدوث الأمراضية، وقد تكون هناك احتمالات عدة لعدم قدرة هذه البكتريا على إنتاج الهيمولايسين، منها أن فعالية الهيمولايسين يحمكها اوبيرون يتكون من 4 جينات تشترك هذه الجينات معا في التعبير عن إنتاج الهيمولايسين، وقد يوجد بينها جين واحد

غير فاعل في التعبير عن هذا الإنتاج مما يؤدي بالتالي الى عدم قدرة البكتريا على إنتاج الهيمولايسين (الزعاك، 1994) .

أثبت الباحث Sukhan *et al.*,2010 أن حدوث طفرة في الجين hns في سلالة *K.pneumoniae* أظهرت قابلية البكتريا على إظهار فعالية لأنتاج الهيمولايسين .

3.2.4 إنتاج أنزيم اليوريز (Urease production) :

تم التحري على قابلية البكتريا لإنتاج أنزيم اليوريز، وأوضحت النتائج أن جميع عزلات *K.pneumoniae* لها القابلية على إنتاج هذه الأنزيم ، وتأتي أهمية هذا الأنزيم من قابليته على تحليل اليوريا الى الأمونيا NH_4 وحامض الكاربونيك H_2Co_3 وهو أنزيم بلوري يحتوي على النيكل، ويمثل عامل ضراوة للعديد من الأحياء المجهرية الممرضة، ويسبب تكوين الحصى في الكلى، وألتهاب حويض الكلى، ويسبب أعتلالاً دماغيا بسبب الأمونيا يُدعى Ammoniaen Cephalopathy، وغيبوبة الكبد (Cartera *et al.*,2009) .

أكد الباحثان (Liu and Bander,2007) إن تكوين أنزيم اليوريز في بكتريا *K.pneumoniae* مسؤول عنه اوبيرون يقع على كروموسوم، وأن تكوين هذا الأنزيم أعلى بحوالي 75 مرة تحت ظروف محددة النتروجين اكثر من وفرته، وهذا يعني أن محدودية كمية النتروجين تزيد من التعبير عن فعالية انتاج أنزيم اليوريز .

4.2.4 إنتاج البكتريوسين (Bacteriocin production) :

أظهرت نتائج العزلات البكتيرية المنتجة للبكتريوسين أن هناك 9 عزلات منتجة للبكتريوسين بنسبة (40.9%) جدول(4-6) شكل (4-5), وكانت العزلات من مصادر متعددة، جاءت هذه النتائج متقاربة مع دراسة أجراها الزبيدي (2012) حول إنتاج بكتريا *Klebsiella* للبكتريوسين اذ بلغت نسبة إنتاج *K.pneumoniae* للبكتريوسين (30.43%).

وان نتائج هذه الدراسة لاتعني أن بقية عزلات البكتريا غير منتجة للبكتريوسين فقد أشار (Cursino *et al.*,2002) أن حدوث تحوير بالمستقبلات الخاصة للكولسين نتيجة حدوث طفرات تؤدي الى تكوين عزلات مقاومة.

أشار Housden *et al.*,2005 أن وجود Cidrophorase في الوسط يثبط فعل الكولسين من خلال تنافسها معه للإرتباط بالمستقبلات على سطح الخلية الحساسة، وبذلك تمنعه من إظهار فعاليته.

أُستخدمت في الدراسة الحالية الوسط الصلب TSA مضافا إليه خميرة بنسبة (1%) إذ أشار الباحث Riley *et al.*,2003 أن إضافة خلاصة الخميرة يزيد من إنتاج البكتريوسين.

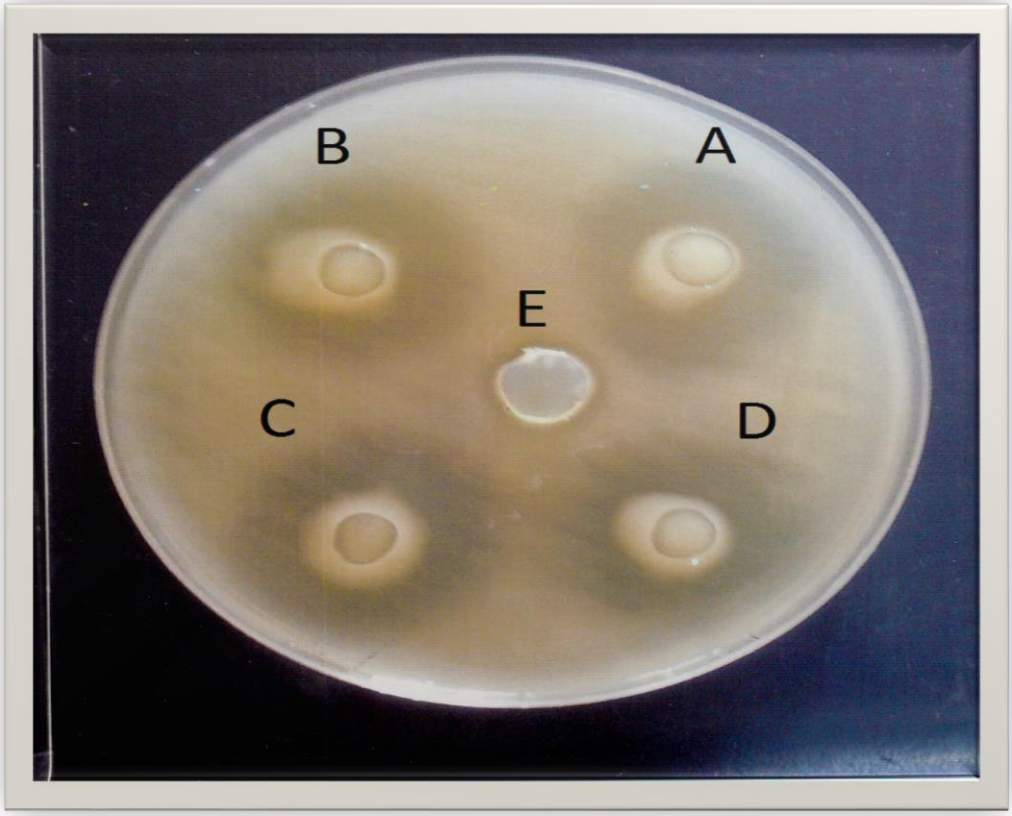
أشار الباحث Al-Charrakh[a] *et al.*,2011 أن الوسط الصلب افضل الأوساط لإنتاج البكتريوسين، وذلك بسبب وجود مستقبلات للخلية البكتيرية في الوسط الصلب وعدم وجودها في الوسط السائل . ولاتعد البكتريوسينات عوامل ضراوة مباشرة وأنما تدعم نمو البكتريا وتكاثرها في البيئات التي تتواجد فيها كالأمعاء مثلا (Riley,1998) .

جدول (4 - 6): قابلية عزلات بكتريا *K.pneumoniae* المعزولة محلياً على إنتاج البكتريوسين

رقم العزلة	المصدر	قطر التثبيط / ملم
7	حروق	8 ملم
13	إدرار	25 ملم
16	إدرار	-
17	قشع	20 ملم
18	قشع	18 ملم
23	حروق	-
26	حروق	-
28	حروق	-
29	حروق	15 ملم
46	إدرار	20 ملم
47	قشع	-
101	حروق	-
107	حروق	18 ملم
108	حروق	-
111	حروق	-
112	قشع	25 ملم
114	إدرار	26 ملم
117	جروح	-
120	حروق	-
126	إدرار	-
127	جروح	-
128	جروح	-

جدول (4-7) : التحليل الأحصائي لقابلية العزلات على إنتاج البكتريوسين

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
urin	3	20.00	26.00	23.6667	3.21455
Burn	3	8.00	18.00	13.6667	5.13160
Seputum	3	18.00	25.00	21.0000	3.60555



شكل (4-5) : أختبار التحري عن إنتاج البكتريوسين للعزلة المحلية *K.pneumoniae*

A,B,C and D= Positive results E= control negative

5.2.4 إنتاج الغشاء الحيوي (Biofilm production):

أظهرت النتائج أن جميع العزلات لها القابلية على إنتاج الغشاء الحيوي وبنسبة 100%، إذ ظهرت جميع المستعمرات سوداء اللون مع كثافة بلورية جافة وهذه هي النتيجة الموجبة (شكل 4-6)، وجاءت هذه النسبة متوافقة مع ما توصلت إليه الخفاجي (2008) إذ بلغت نسبة إنتاج *K.pneumoniae* للغشاء الحيوي وبكميات كبيرة 97.3%، ولم تتفق مع ما توصلت إليه البلداوي (2005) إذ بلغت نسبة عزلاتها المنتجة للغشاء الحيوي وبكميات كبيرة 52%، وأيضا جاءت هذه النسبة متقاربة نسبيا مع ما توصل إليه (Montanaro *et al.*,1999) وبأستعمال طريقة أحمر الكونغو إذ بلغت نسبة إنتاج عزلاته للغشاء الحيوي 83%، وتعد طريقة أحمر الكونغو من الطرائق المفضلة للكشف عن إنتاج البكتريا للطبقة اللزجة بوصفها لاتتأثر بكثافة المزروع البكتيري وأكثر حساسية لأستعمال صبغة أحمر الكونغو المسؤولة عن تصبيغ طبقة متعدد السكريد التي تعد بمثابة المادة الأساس للغشاء الحيوي (Freeman *et al.*,1989).

هناك عدة عوامل بيئية ممكن أن تؤثر على إنتاج الطبقة المخاطية للبكتريا بأستعمال هذه الطريقة منها الأوكسجين، درجة الحرارة، وظروف أخرى ممكن أن تعطي نتائج مغايرة (Götz,2002) .

إن البكتريا التي تنمو في الغشاء الحيوي تكون متحملة للعديد من المضادات الحيوية ومقاومة لكل من الأستساغة Opsonization والبلعمة Phagocytosis ولظروف بيئية مختلفة وأيضا مقاومة لضغوط إنتقائية (Bordi and Bentzmann,2011) .

إن إنتاج *K.pneumoniae* للغشاء الحيوي في أجهزة القثطرة البولية يكون قويا وان الاحياء المجهرية التي تكون الغشاء الحيوي تزيد مقاومتها للمضادات الحيوية حوالي 1000 مرة أكثر من التي لا تكونه، وأن البكتريا المنتجة للغشاء الحيوي مسؤولة عن الإصابات والأمراض التي من الصعب معالجتها بسبب صعوبة وتقييد أختراق المضاد الحيوي للغشاء الحيوي (Hassan *et al.*,2011) .

شكل (4-6) : اختبار التحري عن إنتاج الغشاء الحيوي للعزلة المحلية *K.pneumoniae*

جدول (4-8) : عوامل الضراوة الموجودة في العزلات قيد الدراسة

رقم العزلة	وجود المحفظة	إنتاج الهيمولايسين	إنتاج اليوريز	إنتاج البكتريوسين	إنتاج الغشاء الحيوي
7K.pn	+	-	+	+	+
13K.pn	+	-	+	+	+
16K.pn	+	-	+	-	+
17K.pn	+	-	+	+	+
18K.pn	+	-	+	+	+
23K.pn	+	-	+	-	+
26K.pn	+	-	+	-	+
28K.pn	+	-	+	-	+
29K.pn	+	-	+	+	+
46K.pn	+	-	+	+	+
47K.pn	+	-	+	-	+
101K.pn	+	-	+	-	+
107K.pn	+	-	+	+	+
108K.pn	+	-	+	-	+
111K.pn	+	-	+	-	+
112K.pn	+	-	+	+	+
114K.pn	+	-	+	+	+
117K.pn	+	-	+	-	+
120K.pn	+	-	+	-	+
126K.pn	+	-	+	-	+
127K.pn	+	-	+	-	+
128K.pn	+	-	+	-	+

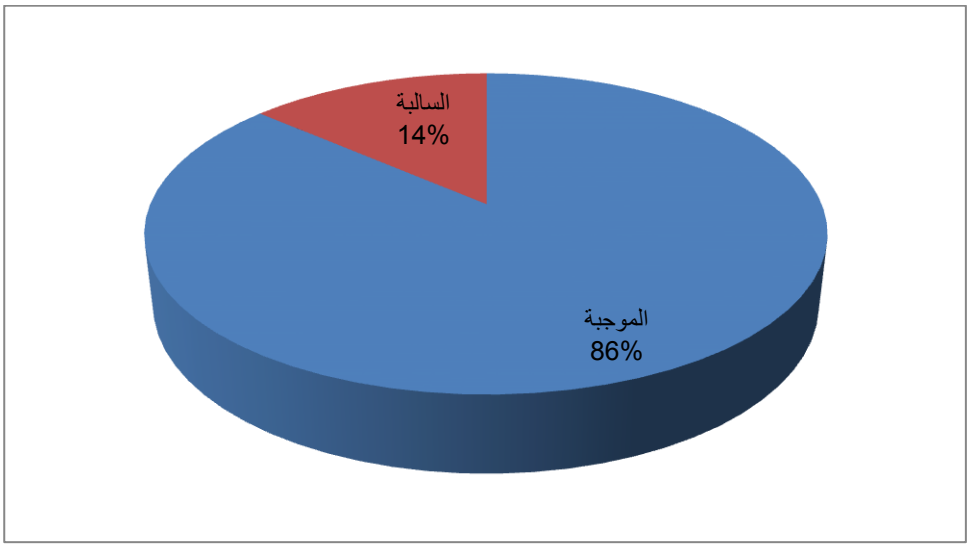
3.4 التحري عن إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز Detection of β-Lactamase production :

اظهرت نتائج هذه الدراسة أن (19) عزلة من مجموع (22) عزلة من بكتريا *K.pneumoniae* أعطت النتيجة موجبة للفحص وبنسبة (86.4%) (شكل 4-7)، وهناك أختلاف واضح في وقت إعطاء النتيجة الموجبة تراوح من عدة ثواني الى 2 دقيقة، إذ يعمل أنزيم البيتا لاكتاميز بأختزال اليود الى ايوديد ويكون الأخير فاقداً لقابلية التفاعل مع النشأ وتكوين معقد بنفسجي يتحول مباشرة الى اللون الابيض، ويمكن تفسير هذا الأختلاف في الوقت على أساس تركيز أنزيم البيتالاكتاميز المنتج في الفسحة البروتوبلازمية، فقد اشار الباحثان Perez

and Hanson,2002 الى أن إختزال اليود الى اليوديد يعتمد على تركيز أنزيم البنسلينيز المنتج في الفسحة البروتوبلازمية بالأضافة الى الحرارة والآس الهيدروجيني .

كلما كان تركيز الأنزيم أكثر، كلما كان الوقت اللازم لظهور النتيجة الموجبة أقل، والعكس صحيح، ويرجع الأمر في ذلك الى الجينات المشفرة لهذه الأنزيمات كانت بلازميدية أم كروموسومية (Phillippon *et al.*,2002).

إن وجود بعض العزلات التي أعطت نتيجة سالبة لفحص البيتالاكتاميز ومقاومتها لمضاد واحد أو أكثر يدل على وجود آليات مقاومة أخرى غير البيتالاكتاميز مثل تغيير بروتينات الغشاء الخارجي بوصفها خطوة لتغيير موقع الهدف (Poirel *et al.*,2000)، أو أمتلاك حاجز النفاذية (Rice *et al.*,2000) بأعتبار إن إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز ليست الآلية الوحيدة في مقاومة مضادات البيتالاكتام، وتتفق نتيجة هذه الدراسة مع دراسة قام بها (الطائي 2006) على إنتاج *K.pneumoniae* لأنزيمات البيتالاكتاميز، إذ بلغت نسبة إنتاج البكتريا لهذا الانزيم (83.3%)، في حين لم تتفق مع دراسة قام بها (السعدون 2007) إذ بلغت نسبة إنتاج *K.pneumoniae* لهذا الأنزيم (50%) .

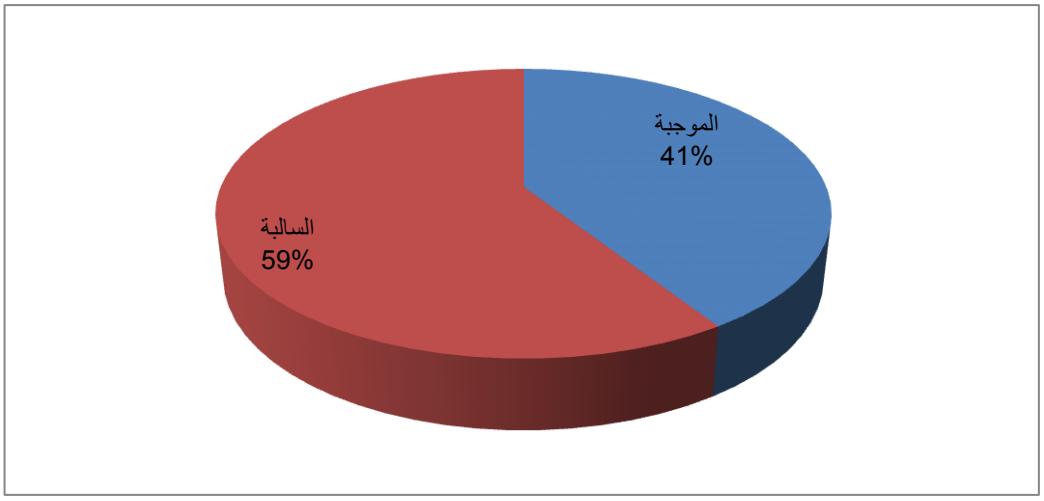


شكل (4-7) : النسب المئوية للعزلات المنتجة وغير المنتجة لأنزيم البيتالاكتاميز .

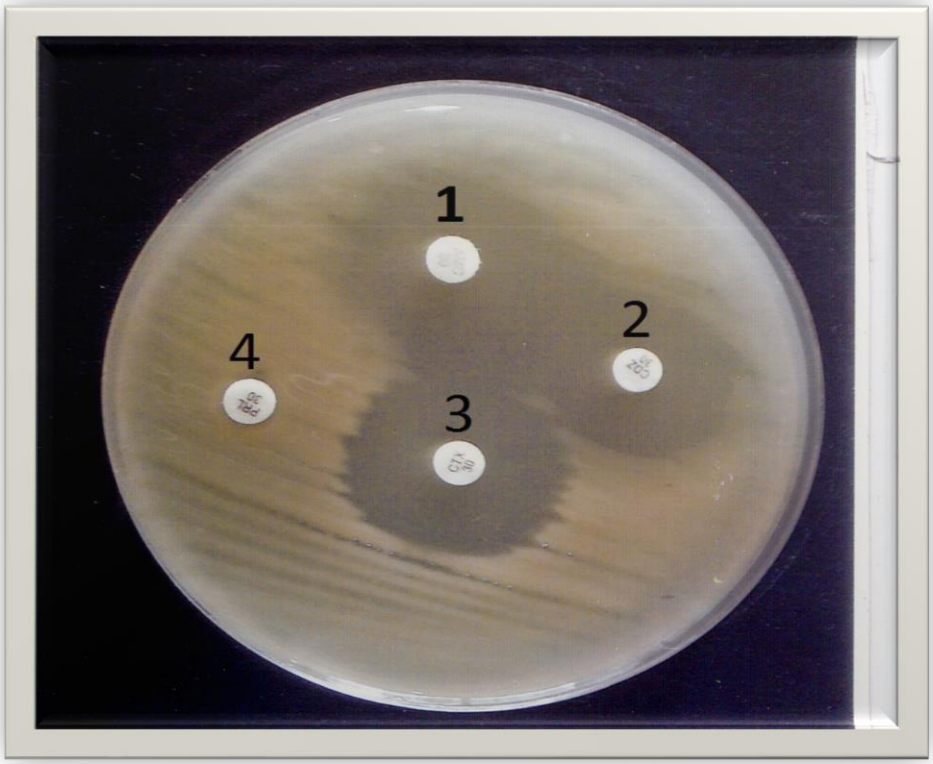
4.4 التحري عن أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف Detection of Extended Spectrum β-Lactamase Enzyme :

أظهرت نتائج هذه الدراسة أن عدد عزلات *K.pneumoniae* المنتجة للأنزيمات الواسعة الطيف كانت (9) عزلات من مجموع (22) عزلة وبنسبة (40.9%) شكل (4 -8، 9 -4)، وجاءت هذه النسبة مقاربة مع دراسة أجراها الباحثون (Shakib *et al.*,2012) على عزلات *K.pneumoniae* المنتجة لهذه الأنزيمات، إذ بلغت نسبة إنتاجها حوالي (42.3%)،

ولم تتفق نتائج هذه الدراسة مع دراسة اجراها الباحثان Aruna and Mobashshera,2012 إذ بلغت نسبة إنتاج البكتريا لهذا الأنزيم (27.5%)، في حين أن نتائج هذه الدراسة كانت قريبة لدراسة أجراها الباحثون Ghafourian et al.,2011 إذ بلغت نسبة إنتاج *K.pneumoniae* لهذه الأنزيمات (37%), أكد الباحثان Sarojamma and Ramakrishna,2011 إن إنتشار السلالات البكتيرية المنتجة للأنزيمات الواسعة الطيف في أي مستشفى يعتمد على عوامل مختلفة منها طريقة أستعمال المضادات الحيوية، ومعدل النقل للسلالات المنتجة بين الأشخاص العاملين والراقدين في المستشفيات، ونوع التعقيم المستخدم في وحدات المستشفى وخاصة في وحدات العناية المركزة .



شكل (4-8) : النسبة المئوية للعزلات المنتجة وغير المنتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز الواسعة الطيف .



شكل (4-9) : إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف للعزلة المحلية *K.pneumoniae*

1- مضاد الاموكساسلين / كلافيولنيك
2- مضاد السيفتازديم
3- مضاد السيفوتاكسيم
4 – مضاد الببراسلين

5.4 التحري عن إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز المعدنية Detaction of Metallo β−Lactamase Production :

أظهرت نتائج هذه الدراسة إن 12 عزلة من عزلات البكتريا قيد الدراسة والبالغة (22) عزلة قد أنتجت هذا الأنزيم وبنسبة 54.5% (جدول 4−9) و (شكل 4−10)، وجاءت هذه النسبة متقاربة مع ما توصل إليه Charan et al.,2012 إذ بلغت نسبة إنتاج *K.pneumoniae* لهذا الانزيم من 71.9 −50% وأيضا هذه النسبة متقاربة نسبيا مع دراسة قام بها PatelG *et al.*,2008 إذ بلغت نسبة إنتاج البكتريا لهذا الانزيم 40% وهذا يعني أن هذا الأنزيم يجعل البكتريا مقاومة لمدى واسع من مضادات البيتالاكتام وذلك بجعل هذه المضادات غير فعالة وذلك بتحليل هذه المضادات (Wang *et al.*,2011) .

,في دراسة أجراها الباحثون Mochen *et al.*,2011 وجدوا ان انزيمات (MBLs) تمنح المقاومة لكل مضادات البيتالاكتام عدا مضاد Aztreonam، ووجد الباحثون Mulvey *et al.*,2011 أن حساسية البكتريا المنتجة لهذا الانزيم لمضاد Aztreonam يكون بسبب عدم قابلية الأنزيم صنف B على تحليل هذا الدواء .

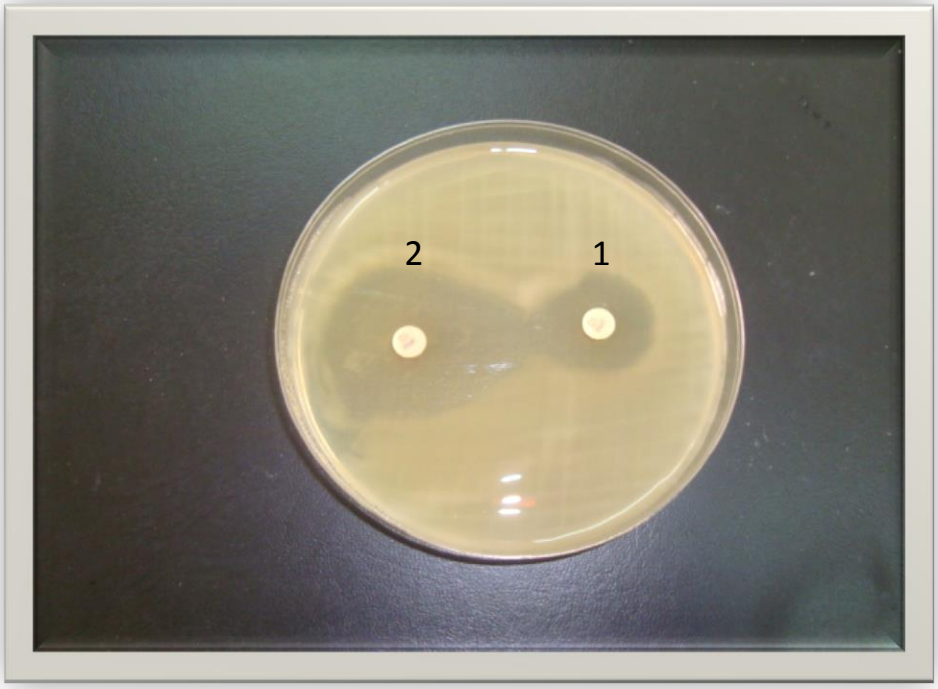
أشار الباحثون Charan *et al.*,2012 أن أستخدام إتحاد المضادين Colisten، Tigecycline مع Meropenem يعد علاجا ناجحا ضد السلالات المنتجة لهذا الانزيم، أو الأتحاد مع Aztreonam أو أي مضاد للـ Monobactam بشرط أن يكون مقاوما للتحلل من قبل أنزيم Metallo lactamases، أما مثبطات أنزيمات الـ MBL هي NXL104 .

جدول (4 – 9) : قابلية عزلات *K.pneumoniae* على إنتاج أنزيم البيتالاكتاميز المعدنية .

رقم العزلة	المصدر	قطر التثبيط / ملم
7	حروق	-
13	إدرار	12 ملم
16	إدرار	-
17	قشع	14 ملم
18	قشع	-
23	حروق	12 ملم
26	حروق	-
28	حروق	14 ملم
29	حروق	-
46	إدرار	15 ملم
47	قشع	-
101	حروق	10 ملم
107	حروق	12 ملم
108	حروق	-
111	حروق	-
112	قشع	15 ملم
114	إدرار	14 ملم
117	جروح	14 ملم
120	حروق	-
126	إدرار	12 ملم
127	جروح	13 ملم
128	جروح	-

جدول (4 – 10) : التحليل الأحصائي لقابلية بكتريا *K.pneumoniae* على إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز المعدنية .

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
urine	4	12.00	15.00	13.25	±1.299
Burn	4	10.00	14.00	12.00	±1.414
Wound	2	13.00	14.00	13.50	±0.50
Sputum	2	14.00	15.00	14.50	±0.50



شكل (4-10): النتيجة الموجبة لإنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز المعدنية للعزلة المحلية *K.pneumoniae*

Imipenem -1 Imipenem and EDTA -2

6.4 مقاومة البكتريا لمضادات الحيوية بطريقة الأقراص Bauer–Kirby :

حُددت مقاومة العزلات قيد الدراسة إتجاه 16 مضاداً من مضادات الحياة المتنوعة وأعتمد على قياس قطر منطقة التثبيط ومقارنتها مع ما ورد في NCCLs,2007، وقد أستعملت مجموعة من مضادات البيتالاكتام، ومضادات الامينوكلايكوسيدات، ومضادات الكوينولونات، بالأضافة الى مضادات أخرى(شكل 4–11)، (ملحق 3).

أظهرت جميع العزلات قيد الدراسة مقاومة كاملة لمضاد الامبسيلين، والكاربنسلين وبنسبة 100%، وجاءت هذه النتائج متوافقة مع الخفاجي (2008) إذ أن عزلاتها كانت مقاومة للمضادين المذكورين وبنسبة 100%، وتتفق هذه النسبة مع ما توصل إليه (Sikarwar and Batra,2011) إذ كانت جميع عزلات *K.pneumoniae* مقاومة للكاربنسيلين بنسبة 100%.

اظهرت العزلات قيد الدراسة مقاومة عالية لمضاد الببراسلين(Pipracillin) والذي يعود الى مجموعة البنسلينات اليوريدية وبنسبة 100%، وجاءت هذه النتائج متوافقة مع ما توصل إليه السعدون (2007) إذ أن مقاومة عزلاته لهذا المضاد بلغت 97.2%، ولاتتفق مع النعيمي (2002)، التي كانت عزلاتها مقاومة لهذا المضاد بنسبة 50%.

بلغت نسبة مقاومة العزلات قيد الدراسة اتجاه Cephalexin وهو من سيفالوسبورينات الجيل الأول 90.9% وهذه النتائج مقاربة لما توصل إليه السعدون (2007) إذ بلغت نسبة مقاومة لهذا المضاد 83.3%، ولا تتفق هذه النتائج مع شغيث (2000) الذي وجد أن عزلاتها مقاومة لهذا المضاد بنسبة 56–80% .

من سيفالوسبورينات الجيل الثالث مضاد Cefotaxime وجد ان مقاومة البكتريا لهذا المضاد بنسبة 81.8%، وتختلف هذه النتائج مع ما توصلت إليه النعيمي (2002) إذ كانت العزلات مقاومة لهذا المضاد بنسبة 17,6%، وتتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه (Sikarwar and Batra,2011) إذ بلغت نسبة مقاومة *K.pneumoniae* لهذا المضاد 76%. ويعود الأختلاف في مقاومة هذا المضاد الى الأستعمال الواسع لهذا المضاد، وتمتلك بكتريا *Klebsiella* بلازميد كبير الحجم يمنحها المقاومة لمضاد Cefotaxime (Li and Lim,2000) . وقد تحدث المقاومة للسيفالوسبورينات ولا سيما الجيل الثالث نتيجة لإنتاج

البكتريا الفائق لأنزيم Cephalosporinase الكروموسومي الذي ينتمي الى أنزيمات البيتالاكتاميز المجموعة الاولى (Nishida *et al.*,1999) .

كانت مقاومة العزلات قيد الدراسة لمضاد Cefixime 59.1% وجاءت هذه النسبة قريبة لما توصلت إليها الملا (2003) إذ كانت نسبة مقاومة العزلات لهذا المضاد 53.4%.

بلغت نسبة مقاومة العزلات قيد الدراسة لمضاد Aztreonam 45.5% وهذه النسبة متقاربة مع ما توصل إليه السعدون (2007) إذ كانت مقاومة عزلاته لهذا المضاد 50%، ولاتتفق هذه النسبة مع دراسة قام بها (Sarogamma and Ramakrishna,2011) إذ بلغت نسبة مقاومة عزلاته لهذا المضاد 70%.

أما مضاد Imipenem الذي ينتمي لمجموعة البيتالاكتام فهو مقاوم لمعظم أنزيمات البيتالاكتاميز، لكنه يتحطم بالأنزيم الكلوي Dehydropeptidase عندما يعطى لوحده، لذا يعطى مع مركب Cilastatin .المرجاني (2011) .

من نتائج فحص الحساسية لهذا المضاد كانت نسبة حساسية العزلات قيد الدراسة 100%, وتتفق هذه النتائج مع دراسة قام بها الباحثون (Benenson *et al.*,2011) حول حساسية العائلة المعوية ومنها *K.pneumoniae* لهذا المضاد إذ بلغت نسبة حساسية البكتريا 100%، وتتفق هذه النتائج أيضا مع الدراسة التي قام بها الباحثون (Ghafourian *et al.*,2011) إذ أثبت أن جميع عزلات *K.pneumoniae* المنتجة لأنزيم ESBLs والغير منتجة لهذا الانزيم حساسة للـ Imipenem وبنسبة 100% . إن حدوث التغيرات الحاصلة في الفتحات البروتينية في الغشاء الخارجي منها فقدان OMPK36 يمنح بكتريا *K.pneumoniae* المقاومة لهذا المضاد (Jiang *et al.*,2012).

لوحظ ان العزلات قيد الدراسة مقاومة بنسبة 90.9% اتجاه مضاد Augmentin، لاتتفق هذه النسبة مع ما وجدته النعيمي إذ كانت العزلات مقاومة بنسبة 35% .

إن مقاومة العائلة المعوية ومنها *K.pneumoniae* لمضادات البيتالاكتام يكون بسبب قابليتها على إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز وتكون مقاومتها بآليات عدة منها تقليل نفاذية المضاد

الى داخل الخلية، وأيضا تحليل المضاد بوساطة أنزيم البيتالاكتاميز، والأخرى تقليل الألفة الى أنزيم Penicillin-Binding Proteins (PBP) (Al-Charrakh[b] *et al.*,2011) .

بالنسبة لمضادات الامينوكلايكوسيدات التي تشمل (Gentamycin, Amikacin, Streptomycin, Tobramycin) ذات التأثير القاتل على البكتريا وذلك عن طريق تثبيط تصنيع البروتين في الخلية (Brooks *et al.*,2007).

بلغت حساسية العزلات قيد الدراسة اتجاه مضاد Amikacin 81.8%، وتتفق مع النعيمي (2002) إذ بلغت الحساسية لهذا المضاد 85%، ولاتتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه الباحثان (Sarojamma and Ramakrishna,2011) إذ كانت نسبة حساسية *K.pneumoniae* لهذا المضاد 56%، ويرجع سبب حساسية العزلات لهذا المضاد بسبب دليله العلاجي الضيق Narrow Therapeutic Index والمتمثلة بإرتفاع سميته للجسم إذ تؤدي تراكيز قليلة منه الى تأثيرات عكسية سامة على عكس المضادات واسعة الطيف العلاجي مثل السيفالوسبورينات والتي تتميز بعدم سميتها للجسم حتى في تراكيزها العالية (Barnhart,2002).

بلغت نسبة المقاومة لمضاد Gentamycin للعزلات قيد الدراسة 63.6%، وتتفق مع ما توصلت إليه الخفاجي (2008) إذ بلغت نسبة المقاومة لهذا المضاد 67.5%, وتتفق مع ما توصل له الباحثان (Sarojamma and Ramakrishna,2011) إذ بلغت نسبة مقاومة *K.pneumoniae* لهذا المضاد حوالي 60%.

إن مقاومة العزلات البكتيرية للأمينوكلايكوسيدات تشير الى أن العزلات ذات مستوٍ عال من المقاومة High-Level Resistance لهذه المجموعة (Barnhart,2002).

أما بالنسبة لمضادات الكينولونات التي يكون تأثيرها قاتلاً على البكتريا من خلال تثبيط تصنيع الـ DNA وذلك عن طريق إيقاف أنزيم DNA gyrase وتشمل مضادات Norfloxacin, Ciprofloxacin, and Nalidixic acid (Brooks *et al.*,2007).

بلغت نسبة حساسية العزلات قيد الدراسة لمضاد الـ Ciprofloxacin 72.7% وتتفق هذه النسبة مع ما توصل إليه الباحثون (Yedekci *et al.*,2012) إذ بلغت نسبة حساسية عزلاته لهذا المضاد 66.6% .

إن مقاومة بكتريا *Klebsiella* لمضادات الكينولونات تكون بوساطة مضخات الدفق التي تسبب مقاومة متعددة للمضادات الحيوية والتي تنظم بوساطة 38 جين أو أوبيرون في البكتريا، 19 من هذه الجينات مسؤولة مباشرة عن تطوير المقاومة للمضادات الحيوية ومنها الكوينولونات وذلك عن طريق تغيير في الجزيئة الهدف وتقليل النفاذية (Yedekci *et al.*,2012).

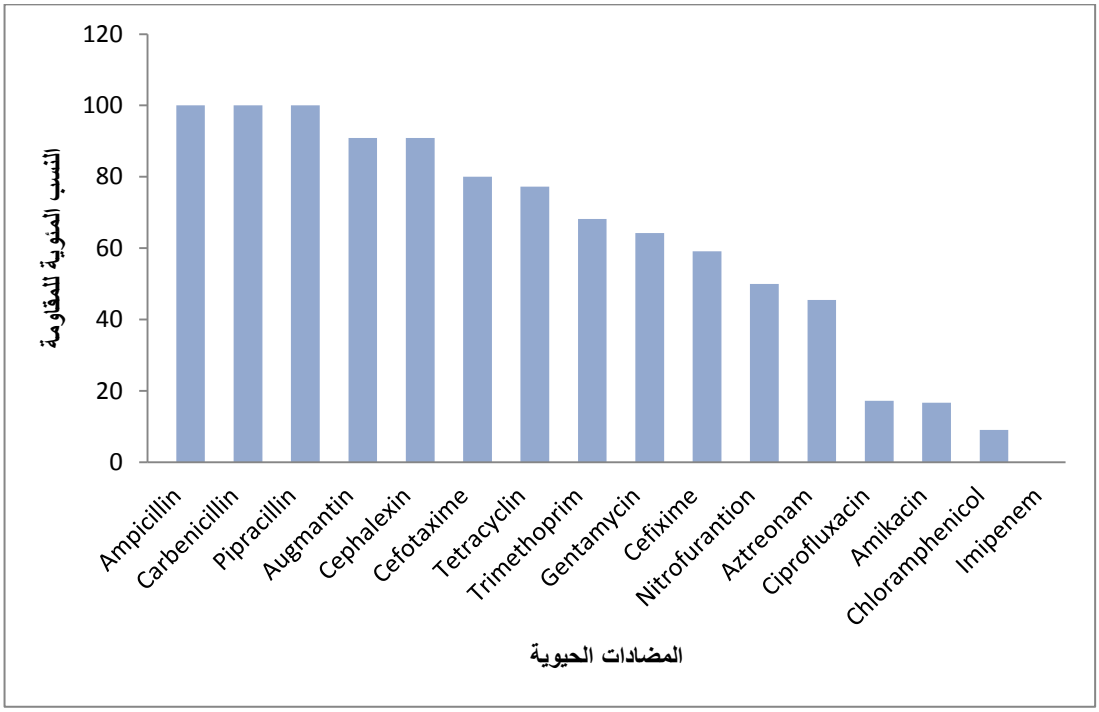
أما بالنسبة لمضاد Chloramphenicol فقد بلغت نسبة حساسية العزلات قيد الدراسة لهذا المضاد 90.9% وتقترب هذه النتائج مع ما توصل إليه السعدون (2007) إذ بلغت نسبة حساسية عزلاته لهذا المضاد 83.3%، ولاتتفق مع ما توصل إليه (Sikarwar and Batra,2011) إذ بلغت نسبة حساسية عزلاتهم لهذا المضاد حوالي 40% المقاومة لمضاد Chloramphenicol يكون بوساطة إفراز أنزيم Chloramphenicol acetyl transferase الذي يكون تحت سيطرة بلازميد (Brooks *et al.*,2007) .

أما مضاد Tetracycline، كانت نسبة مقاومة العزلات قيد الدراسة لهذا المضاد 77.3%، وتتفق هذه النسبة مع ما توصل إليه الباحثان (Sarojamma and Ramakrishna,2011) إذ بلغت نسبة المقاومة لهذا المضاد 84% .

بالنسبة لمضاد Trimethoprim بلغت نسبة مقاومة العزلات لهذا المضاد 68.2%، وقد أشار الباحثون Kumar *et al.*,2011 أن أنتكرون class 1 مسؤول عن مقاومة بكتريا *K.pneumoniae* للـ Trimethoprim، وقد أكد الباحثون Shen *et al.*,2001 أن بكتريا الكليبسيلا تظهر مقاومة مشتركة لمضادات الأمينوكلايكوسيدات، والتتراسايكلين، والترايميثبريم .

أما مضاد NitroFurantion فقد بلغت نسبة مقاومة العزلات قيد الدراسة لهذا المضاد 50% وتتفق هذه النتائج مع الملا (2003) إذ كانت عزلاتها مقاومة لهذا المضاد بنسبة 55%، ولاتتفق مع الخفاجي (2008) إذ بلغت نسبة المقاومة 24.3%.

إن مقاومة بكتريا الفلورا الطبيعية في الامعاء جاءت نتيجة أكتسابها للبلازميدات ذات المقاومة المتعددة من البكتريا المجاورة لها في الامعاء عن طريق عمليات الاقتران البكتيري والتحويل الوراثي والتوصيل (Martinez-Martinez *et al.*,1998) .



شكل (4-11) : النسب المئوية لمقاومة بكتريا *K.pneumoniae* للمضادات الحيوية المختلفة

7.4 المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية Multiple Antibiotic Resistance :

أصبح إنتشار الجينات التي تحمل المقاومة للمضادات الحيوية مشكلة تهدد الصحة العالمية وتساهم البلازميدات في إنتشار هذه المقاومة بوساطة البكتريا الممرضة (Bistue *et al.*,2008).

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن عزلات *K.pneumoniae* المحلية جميعها تحمل صفة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية وتشير النتائج أن العزلة Kpn46 كانت أكثر العزلات مقاومة للمضادات الحيوية إذ أستطاعت مقاومة 15 مضاداً حيوياً (جدول 4-11)، أما العزلة Kpn101 هي العزلة الأكثر حساسية بين العزلات إذ أستطاعت مقاومة 6 مضادات حيوية

فقط، وتتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه السعدون (2007) إذ أن أكبر مقاومة لعزلات بكتريا الكليبسيلا كانت من نصيب *K.pneumoniae* إذ أستطاعت مقاومة 22 مضاداً حيويا، في حين كانت أقل مقاومة لهذه البكتريا هي 6 مضادات حيوية .

كما أوضحت الخفاجي (2008) في دراسة على البكتريا ذاتها المعزولة من الأخماج المصاحبة للمثبتات الخارجية المستعملة في جراحة العظام والكسور تملك صفة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية، إذ أن أعلى نسبة للمقاومة في عزلاتها 100% لمجموع 6 مضادات حيوية وأن أقل نسبة للمقاومة كانت 24%.

جدول 4 – 11 : المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية التي أظهرتها عزلات *Klebsiella pneumonia*

عدد المضادات التي قاومتها العزلات	عدد العزلات	أرقام العزلات
6	1	Kpn101
7	4	Kpn (7,17,47,18)
8	3	Kpn (23,28,107)
9	3	Kpn (26,29,108)
10	2	Kpn (120,127)
11	5	Kpn (13,16,111,117,128)
13	1	Kpn112
14	2	Kpn (114,126)
15	1	Kpn46

تم تقسيم عزلات *K.pneumoniae* قيد الدراسة الى مجموعتين على أساس عدد المضادات التي قاومتها (جدول 4–12) إذ وضعت العزلات المقاومة (6– 10) مضادات حيوية في المجموعة الأولى، أما العزلات المقاومة (11– 15) مضاد حيوي في المجموعة الثانية وكانت المجموعة الأولى هي المجموعة السائدة في الدراسة إذ إحتوت على 13 عزلة بكتيرية من مجموع 22 عزلة وبنسبة (59.1%)، بينما كانت أقل نسبة مقاومة متعددة للمضادات الحيوية ضمن الدراسة الحالية أظهرتها المجموعة الثانية وبنسبة (40.9%) من العزلات الكلية.

جدول 4 – 12 : تقسيم العزلات المحلية لبكتريا *Klebsiella pneumonia* الى مجموعتين على أساس عدد المضادات التي قاومتها.

المجموعة	عدد المضادات التي قاومتها	عدد العزلات المقاومة	النسبة المئوية (%)
1	10 – 6	13	59.1
2	15 – 11	9	40.9
المجموع		22	100

8.4 النسق السائد للمقاومة المتعددة لبكتريا *K.pneumoniae* للمضادات الحيوية :

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن نسق المقاومة السائد للمقاومة المتعددة للمضادات الحيوية يقع ضمن المجموعة الثانية (جدول 4 – 12)، وبعد تحليل المعلومات الخاصة بمقاومة كل عزلة للمضادات الحيوية المستخدمة في هذه الدراسة تبين أن نسق المقاومة السائد لعزلات البكتريا قيد الدراسة هو 11 مضاد (جدول 4 – 13) وكما يأتي:

Amp – Cb – PRL – Amc – CL – Ce – TE – TMP – CN – CFm – FT

يتضح من النتائج المسجلة في (الجدول 4 – 13) أن هناك جيناً مقاوماً لمضاد واحد يضاف الى نسق المقاومة للمضادات ATM,CF,AK لدرجات المقاومة 12,13,14 ضمن المجموعة الثانية على التوالي.

جدول 4 – 13 : النسق السائد للمقاومة المتعددة للمضادات الحيوية .

درجة تعدد المقاومة	نوع المضادات
11	Amp – Cb – PRL – Amc – CL – Ce – TE – TMP – CN – CFm – FT
12	Amp – Cb – PRL – Amc – CL – Ce – TE – TMP – CN – CFm – FT- ATM
13	Amp – Cb – PRL – Amc – CL – Ce – TE – TMP – CN – CFm – FT – ATM - CF
14	Amp – Cb – PRL – Amc – CL – Ce – TE – TMP – CN – CFm – FT – ATM – CF - AK

9.4 تحديد التراكيز المثبطة الدنيا لعدد من المضادات الحيوية :

تشير نتائج الدراسة الحالية وكما موضح في الجدول (4 – 14) الى أن العزلات جميعها أبدت مقاومة لكل من المضادات Ampicillin, Pipracillin وتراوحت قيم M.I.C لهذين المضادين (1024– 512) مكغم / مليليتر، وهذه النتائج تتفق مع ماتوصل إليه (Garcia–Sureda *et al.*,2011) إذ كانت عزلاته مقاومة للـ Pipracillin بنسبة 100%، وتتفق هذا النتائج أيضا مع ما توصل إليه (Al–Gamy,2012) إذ بلغت نسبة المقاومة للـ , Ampicillin Pipracillin 100% .

تراوحت قيم M.I.C لمضاد Cephalexin (1024– 64) مكغم/ مليليتر, وتتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه السعدون (2007) إذ تراوحت قيم M.I.C لعزلاته بين ≥32– (1024≥) مكغم / مليليتر، ولم تتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه الباحثون (Kumar *et al.*,2011) إذ تراوحت قيم M.I.C لهذا المضاد 8 مكغم/ مليليتر.

تراوحت قيم M.I.C لمضاد Cefotaxim (256–16) مكغم/مليليتر، ولاتتفق هذه النتائج مع (Al–Gamy,2012) إذ بلغت قيم M.I.C لهذا المضاد (32< – 0.5) مكغم/مليليتر.

بلغت قيم M.I.C لمضاد Ceftriaxone بين (128–8) مكغم / مليليتر، وتتفق هذه النتائج جزئيا مع ما توصل إليه (Wang *et al.*,2009) إذ بلغت قيم M.I.C لهذا المضاد 256< مكغم/مليليتر.

يعزى سبب المقاومة لمضادات السيفالوسبورينات الى الضغط المستمر لأستعمال المضادات والذي ينتج عنه تطور صفة المقاومة وخاصة عن طريق موقع الهدف أو عن طريق أنظمة الدفق، وكل هذه الميكانيكيات يشفر لها كروموسوميا (Ruiz,2003).

بلغت قيم M.I.C لمضاد Imipenem بين (32–4) مكغم/ مليليتر، وتتفق نتائج هذه الدراسة جزئيا مع (Wendt *et al.*,2010) إذ بلغت قيم M.I.C (16≥ – 2)، وتتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه الباحثون (Jiang *et al.*,2012) إذ بلغت قيم M.I.C لهذا المضاد

(4–32) مكغم / مليليتر، وقد أشاروا الى أن مضادات الكاربابنيم (Meropenem and Imipenem) هي الدواء المختار (Drug of Choice) لعلاج الأصابات الحادة المتسببة عن العائلة المعوية وذلك بسبب أستقرارية هذه المضادات العالية ضد أنزيمات (ESBLs,AMPC).

تراوحت قيم الـ M.I.C لمضاد Aztreonam بين (256–8) مكغم/ مليليتر، وأتفقت هذه النتائج جزئيا مع (Wang *et al.*,2009) إذ بلغت قيم M.I.C لهذا المضاد (32 – 256≤) مكغم /مليليتر .بينما كانت قيم M.I.C لمضاد Amikacin (128–16) مكغم/ مليليتر وتتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه (Al-Gamy,2012) اذ تراوحت قيم M.I.C لهذا المضاد (128–4) مكغم/ مليليتر، و تتفق هذه النتائج أيضا مع ما توصل إليه (Jaing *et al.*,2012) إذ تراوحت قيم M.I.C لهذا المضاد من (256< –4) مكغم /مليليتر.

بلغت قيم M.I.C لمضاد Augmentin بين (1024–32) مكغم/مليليتر إذ كانت جميع العزلات مقاومة لهذا المضاد بأستثناء 3 عزلات كانت قيم M.I.C فيها مساوية لنقطة التوقف, وتتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه (Jaing *et al.*,2012) إذ أظهرت جميع عزلات *K.pneumoniae* مقاومة لهذا المضاد بنسبة 100%.

بلغت قيم M.I.C لمضاد Ciprofloxacin بين (64–4) مكغم/ مليليتر، وتتفق هذه النتائج مع السعدون (2007) اذ بلغت قيم M.I.C لهذا المضاد (2– 64) مكغم/ مليليتر، وتتفق هذه النتائج جزئيا مع ما توصل إليه (Kumar,2011) إذ بلغت قيم M.I.C لهذا المضاد (32) مكغم/ مليليتر.

وجد ان قيم M.I.C لمضاد Chloramphenicol (32– 4) مكغم / مليليتر إذ كانت أغلب العزلات قيد الدراسة حساسة لهذا المضاد، وتتفق هذه النتائج جزئيا مع (Al-Gamy,2012) اذ بلغت قيم M.I.C لهذا المضاد (128<) مكغم/ مليليتر. ويسبب الكلورامفينيكول أضطرابات في كريات الدم الحمر الناضجة ومرض فقر الدم، ولهذه الأسباب فأن أستعمال هذا المضاد يكون مقيدا في العلاج (Brooks *et al.*,2007).

أما مضاد Trimethoprim فقد تراوحت قيم M.I.C لهذا المضاد بين (1024–32) وتتفق هذه النتائج مع السعدون (2007) اذ تراوحت قيم M.I.C عزلاته بين (1024–8) مكغم/

ملليليتر، ولم تتفق هذه النتائج مع (Al-Gamy,2012) اذ تراوحت قيم M.I.C لعزلاته بين (64< – 32) مكغم/ ملليليتر.

جدول (4-14) : قيم التركيز المثبط الأدنى لبعض المضادات الحيوية (Drug of Choice) في علاج الألتهابات المتسببة عن بكتريا *Klebsiella pneumonia*

المضـــاد الحيوي / نقطـــــة التوقف (*مايكروغرام/ ملليليتر*)												رقم العزلة
TMP	AK.	CF	C	AMC	IMP	ATM	CRO	Ce	CL	PRL	AMP	
16	64	4	32	32	16	32	64	64	32	128	32	
128	32	32	4	512	8	16	128	16	256	1024	1024	7
512	128	64	32	128	32	256	64	256	512	1024	1024	13
128	32	32	8	512	4	16	128	16	512	512	1024	16
512	64	8	8	512	4	16	32	64	64	512	1024	17
512	16	32	8	512	8	32	32	16	64	512	1024	18
128	32	16	16	32	16	32	128	16	512	1024	1024	23
32	16	8	8	32	16	16	32	256	512	512	1024	26
512	16	16	16	64	8	16	32	16	64	512	1024	28
128	32	32	8	512	4	256	32	64	64	512	1024	29
256	128	64	16	1024	32	256	128	256	1024	1024	1024	46
256	32	16	8	512	16	256	16	256	128	512	1024	47
128	16	16	8	64	4	8	8	16	256	512	1024	101
512	32	16	8	512	8	8	8	128	1024	512	1024	107
512	16	8	4	128	16	8	8	128	256	512	1024	108
128	16	8	4	512	4	16	16	256	256	512	1024	111
512	128	32	16	1024	32	16	128	256	1024	1024	1024	112
1024	128	64	32	512	32	256	128	256	512	1024	1024	114
1024	64	16	16	64	32	64	8	64	128	512	1024	117
128	64	16	32	128	4	8	128	16	128	512	1024	120
512	64	32	8	64	16	16	32	128	256	512	1024	126
512	32	16	16	512	4	16	32	16	1024	512	1024	127
128	64	64	32	512	16	8	64	16	512	1024	1024	128

***AMP.: Ampicillin PRL.: Piperacillin CL.: Cephalexin Ce.: Cefotaxime**
CRO.: Ceftriaxone ATM.: Aztreonam IMP.: Imipenem AMC.: Augmentin
C.: Chloramphenicol CF.: Ciprofloxacin AK.: Amikacin TMP.: Trimethoprim

10.4 تحمل بكتريا *K.pneumoniae* لبعض المعادن الثقيلة :

لقد أظهرت نتائج الدراسة الحالية مدى تحمل *K.pneumoniae* للمعادن الثقيلة جدول (4-15)، قد أستخدمت المعادن (الزنك، والزئبق، والفضة، والنحاس، والكوبلت) وبتراكيز مختلفة.

أظهرت 11 عزلة من مجموع 22 عزلة لها القابلية على تحمل 1.5 ملي مول من معدن الكوبلت وهو أعلى تركيز أستطاعت البكتريا تحمله وبنسبة 50% (شكل 4-11)، بينما تحملت 3 عزلات أقل تركيز لهذا المعدن 0.5 ملي مول وبنسبة 13.6%، وتحملت 8 عزلات تركيز 1 ملي مول لهذا المعدن وبنسبة 36.4%.

أما بالنسبة لمعدن النحاس فقد كان أعلى تركيز تحملته العزلات قيد الدراسة هو 3 ملي مول، إذ تحملت 11 عزلة هذا التركيز وبنسبة 50% (شكل 4-11)، اما أقل تركيز تحملته 4 عزلات لهذا المعدن هو 0.5 ملي مول وبنسبة 18.2 %، أما باقي العزلات فقد تحملت تراكيز للنحاس تراوحت بين 1,2,2.5 ملي مول لهذا المعدن , ويرتبط النحاس بمواقع خاصة على أي حامض آميني للكائن المجهري ويعيد دورة الأكسدة والأختزال ويولد تفاعلات يحرر منها جذور الهايدروكسيد الحرة قرب مواقع الأرتباط هذه مما يسبب أضرار متعددة للحامض الاميني (Borkow and Gabbay,2005).

بالنظر الى نتائج الفضة فقد تمكنت 7 عزلات من مجموع 22 عزلة من تحمل أعلى تركيز لهذا المعدن 0.03 ملي مول وبنسبة 31.8% (شكل 4-11)، بينما أقل تركيز تحملته 8 عزلات كان 0.01 ملي مول وبنسبة 36.4%، بينما تحملت العزلات الـ 7 الباقية تركيز 0.02 ملي مول وبنسبة 31.8% لهذا المعدن, إن مقاومة البكتريا لأيون الفضة سُجلت بشكل دوري من مصادر مختلفه مثل المستشفيات، ردهات الجروح والحروق، عندما تكون نسبة سُمية الفضة متوقعة للمقاومة (Gupta,2001).

تمكنت 6 عزلات من تحمل أعلى تركيز 0.03 ملي مول من معدن الزئبق وبنسبة 27.3% (شكل 4-12), وأقل تركيز تحملته 8 عزلات كان 0.01 ملي مول وبنسبة 36.4%.

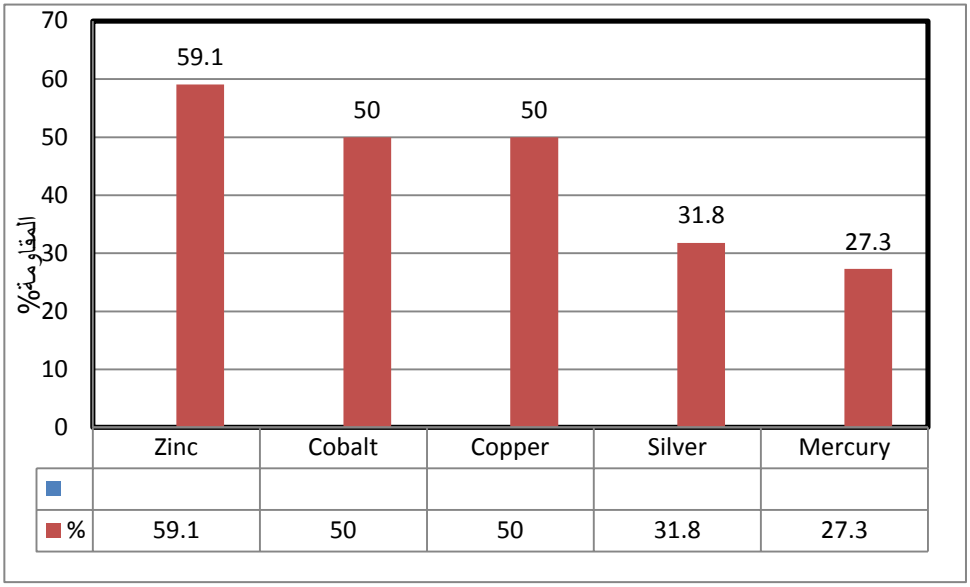
إن مقاومة الزئبق تنجز بوساطة إزالة السموم الأنزيمي في كل من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام، هناك مجموعة من الجينات تُشفر لإنتاج الفسحة البلازمية المرتبطة بالبروتين والغشاء المرتبط بنقل البروتين، وتقوم الفسحة البلازمية المرتبطة بالبروتين بجمع Hg^{+2} من البيئة المحيطة ثم تنقله الى السايتوبلازم ليتعادل بكيميائية الأكسدة والأختزال (Bruins *et al.*,2000) , وتشير نتائج معدن الزنك ان 13 عزلة من العزلات قيد الدراسة من تحمل أعلى تركيز لهذا المعدن 1.5 ملي مول وبنسبة 59.1% (شكل 4-11)، وأقل تركيز تحملته 4 عزلات هو 0.5 ملي مول وبنسبة 18.2%، بينما تمكنت 5 عزلات المتبقية من تحمل 1 ملي مول من هذا المعدن وبنسبة 22.7%.

جدول (4-15) : تحمل بكتريا *Klebsiella pneumonia* لتراكيز بعض المعادن الثقيلة / ملي مول .

رقم العينة	CO	CU	AG	HG	ZN
7	1	3	0.03	0.02	0.5
13	1	3	0.01	0.01	1.5
16	1	3	0.02	0.02	1
17	1.5	2.5	0.01	20.0	1.5
18	1	2.5	0.02	0.02	1.5
23	1	3	0.01	0.01	1
26	0.5	1	0.02	0.01	1.5
28	1.5	1	0.02	0.02	0.5
29	1	3	30.0	30.0	0.5
46	1.5	3	0.03	0.03	1.5
47	1.5	0.5	0.02	0.02	1
101	1	0.5	20.0	0.01	1.5
107	1.5	0.5	0.01	0.02	1
108	1.5	1.5	0.01	0.01	0.5
111	1	1.5	0.01	0.01	1.5
112	1.5	3	0.03	0.03	1.5
114	1.5	3	0.03	0.03	1.5
117	1.5	3	30.0	30.0	1,5
120	0.5	2	0.03	0.01	1
126	1	3	0.02	0.01	1.5
127	0.5	3	0.01	0.02	1.5
128	1.5	0.5	0.01	0.03	1.5

الكوبلت:co النحاس:cu الفضة:Ag الزئبق:Hg الزنك:Zn

إن مقاومة البكتريا للمعادن الثقيلة قد تكون نتيجة لوجود البلازميد الذي يتوسط مقاومة المعادن، وقد سجلت في بعض عزلات العائلة المعوية من الإصابات المكتسبة بلازميدات أقترانية تُشفر لمقاومة مختلف المعادن الثقيلة (Egbebi and Famurewa,2011).



شكل (4-12) : النسب المئوية لمقاومة بكتريا *Klebsiella pneumonia* لمجموعة من المعادن الثقيلة

11.4 العلاقة بين مقاومة العزلات للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة:

أظهرت العزلات قيد الدراسة أستجابات مختلفة للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة تراوحت بين المقاومة والحساسة للمضادات بعضها أو جميعها، فمثلا أستطاعت العزلة Kpn46 المعزولة من الادرار من مقاومة 15 مضاد حيوي وبنسبة (93.8%)، وتحمل 5 معادن ثقيلة (Zn,Hg,Ag,Cu,Co)، وبنسبة (100%)، بينما تمكنت العزلة Kpn101 والمعزولة من الحروق من مقاومة 6 مضادات حيوية وبنسبة (37.5%)، وتحمل 1 معدن ثقيل وبنسبة (20%)، (جدول 4 – 16). إن العزلات المأخوذة من الادرار هي الاكثر مقاومة للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة، وقد أشار الباحثون Kumar *et al.*,2011 أن هناك خطورة عالمية لعزلات *K.pneumoniae* ذات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية التي تسبب الاصابات المكتسبة واصابات الجهاز البولي وأن وبائية هذه البكتريا تحدث بسبب جينات خاصة لمقاومة المضادات الحيوية. أما بالنسبة للعزلات المأخوذة من الحروق فقد سجلت أدنى معدل مقاومة

للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة. من خلال نتائج الدراسة الحالية تبين إن نجاح وسائل السيطرة على الأصابات في وحدات الحروق مثل التدريب الجيد للعاملين الصحيين في هذه الوحدات، ومنع أنتشار الممرضات البكتيرية في هذه الوحدات من خلال المتابعة والتحري المستمر عن طريق أخذ العينات منها وبشكل دوري، ومتابعة طرق العلاج المتبعة في هذه الوحدات ونتائجها وتأثيراتها, أدت مجتمعة الى أن تكون مقاومة البكتريا في هذه الوحدات في أدنى معدل قياسا الى مقاومة البكتريا في الادرار، والقشع، والجروح .

جدول (4 – 16): النسب المئوية لمقاومة العزلات قيد الدراسة لبعض من المضادات الحياتية والمعادن الثقيلة

رقم العزلة	مكان العزل	عدد المضادات التي قاومتها العزلات	%	عدد المعادن الثقيلة التي قاومتها العزلات	%
Kpn13	الادرار	11	68.8	2	40
Kpn16	الادرار	11	68.8	2	40
Kpn46	الادرار	15	93.8	5	100
Kpn114	الادرار	14	87.5	5	100
Kpn126	الادرار	14	87.5	2	40
Kpn17	القشع	7	43.8	2	40
Kpn18	القشع	7	43.8	1	20
Kpn47	القشع	7	43.8	1	20
Kpn112	القشع	13	81.3	5	100
Kpm7	الحروق	7	43.8	2	40
Kpn23	الحروق	8	50	1	20
Kpn26	الحروق	9	56.3	1	20
Kpn28	الحروق	8	50	1	20
Kpn29	الحروق	9	56.3	3	60
Kpn101	الحروق	6	37.5	1	20
Kpn107	الحروق	8	50	1	20
Kpn108	الحروق	9	58.3	1	20
Kpn111	الحروق	7	56.3	2	40
Kpn120	الحروق	10	62.5	1	20
Kpn117	الجروح	11	68.8	5	100
Kpn127	الجروح	10	62.5	2	40
Kpn128	الجروح	11	68.8	3	60

إن الأحياء المجهرية المقاومة للمضادات الحيوية والمتحملة للمعادن الثقيلة يكون إنتشارها بشكل سريع، وأن هاتين الصفتين غالباً ما تكون محمولتين على البلازميد، لذلك فأن هذه الأحياء تتكيف للظروف بشكل سريع بسبب إنتشار عوامل R أكثر من تلك التي تحدث بوساطة الطفرات مما يؤدي الى زيادة سريعة جدا في أعدادها وبالتالي تؤدي الى مشاكل خطيرة على الصحة العامة (Bhattacherjee *et al.*,1988).

أشار الباحثون Knapp *et al.*,2011 إن الجينات المسؤولة عن مقاومة المعادن مرتبطة مع تلك الجينات المسؤولة عن مقاومة المضادات الحيوية، وتكون هذه الجينات متنقلة، وتُشفر هذه الجينات كذلك لميكانيكية إزالة السموم مثل مضخات الدفق والتي بدورها تختزل التراكيز الداخل خلوية لكل من المعادن والمضادات الحيوية، أو قد تتضمن المقاومة جينات منفصلة تندمج مع بعضها وتكون عناصر جينية واحدة مسؤولة عن تلك المقاومة .

جدول (4 – 17): التحليل الأحصائي للعلاقة بين مقاومة المضادات الحيوية والمعادن الثقيلة لعزلات *Klebsiella pneumonia* قيد الدراسة

نوع العزلات	عدد العزلات	نوع مقاومة البكتريا	أدنى عدد المقاومة	أعلى عدد المقاومة	الوسيط(m)	الانحراف المعياري(St)
الادرار	5	المضادات الحيوية	11	15	13	±1.7
		المعادن الثقيلة	2	5	3.2	±1.5
القشع	4	المضادات الحيوية	7	13	8.5	±2.6
		المعادن الثقيلة	1	5	2.3	±1.6
الحروق	10	المضادات الحيوية	6	10	8.1	±1.1
		المعادن الثقيلة	1	3	1.4	±0.7
الجروح	3	المضادات الحيوية	10	11	10.7	±0.5
		المعادن الثقيلة	2	5	3.3	±1.2

12.4 النسق البلازميدي لبكتريا *K.pneumoniae*

وقد تم التحري عن المحتوى البلازميدي للعزلات قيد الدراسة سيما تلك التي أظهرت مقاومة متعددة للمضادات الحيوية وعدد من أملاح المعادن الثقيلة وذلك بأستخدام Pure Yield Plasmid Miniprep Kit المجهز من قبل شركة Promega (U.S.A)، وبعد عزل الدنا

البلازميدي وترحيل الدنا المستخلص على هلام الأكاروز أظهرت نتائج الدراسة الحالية أحتواء جميع العزلات قيد الدراسة على 2 حزمة من البلازميد تختلف في الحجم إذ أحتوت هذه العزلات على Mega Plasmid (شكل 4-13)، فيما خلت 4 عزلات من أي حزم بلازميدية على الرغم من أحتوائها على مقاومة متعددة للمضادات الحيوية وبعض املاح المعادن الثقيلة فضلاً عن إنتاجها لأنزيمات البيتالاكتاميز، ويمكن أن يعود سبب المقاومة لهذه العزلات الى كون صفة المقاومة وإنتاج الأنزيم فيها محمول على الكروموسوم أو أحدى طرائق المقاومة الأخرى.

لاتوجد علاقة بين المحتوى البلازميدي ونمط المقاومة للمضادات الحيوية، فهناك نمط مقاومة يمكن أن يُشفر بوساطة ترانسبوزون، وعاثيات، وجينات كروموسومية ولاعلاقة لها بالبلازميدات (Karbasizaed *et al.*,2003) .

تتفق هذه النتائج مع ما وجده (Wei *et al.*,2005) بأن جميع عزلات *K.pneumoniae* تحتوي على حزمتين بلازميديتين مختلفتي الوزن الجزيئي، وتتفق أيضا مع ما وجده (Al-Charrakh^{c} *et al.*,2011) بأن عزلات *K.pneumoniae* ذات حجوم مختلفة وبعض منها يحتوي على Mega Plasmid الذي يُشفر للمقاومة المتعددة للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة .

أشار الباحث Lipuma وزملاؤه (1989) الى أمكانية أستخدام النسق البلازميدي إضافة الى نسق المقاومة للمضادات الحيوية في تحديد مدى التقارب بين السلالات البكتيرية وبالتالي معرفة وبائيتها.

13.4 الأقتران البكتيري:

A: الاقتران في الوسط السائل:

أُجريت عملية الأقتران البكتيري، وذلك للوقوف على الدور الذي تؤديه البلازميدات (خاصة الأقترانية منها) في إمكانية نقل صفة المقاومة للمضادات الحيوية والتحمل لعدد من املاح المعادن الثقيلة المستعملة، بالإضافة الى نقل صفة إنتاج أنزيم البيتا لاكتاميز وقد أستخدمت طريقة التخافيف العُشرية ونميت العزلات على أوساط إنتقائية حاوية على معلمين – 2 Markers هما مضادي الريفامبسين والأمبسيلين، ولم تنجح العزلات قيد الدراسة في تحقيق

عملية الأقتران، كررت هذه التجربة ثلاث مرات وعلى الرغم من ذلك لم يتم الحصول على مستعمرات مقترنة بالرغم من إحتواء العزلات على بلازميدات كانت تُشفر لمقاومة المضادات الحيوية وبعض المعادن الثقيلة . وربما تكون البلازميدات ذات طبيعة أقترانية لكنها فشلت بالأقتران بسبب قلة التماس بين الخلايا الواهبة والمستلمة في الوسط السائل.

B: الأقتران البكتيري في الوسط الصلب (طريقة Seldeen,K.1999) :

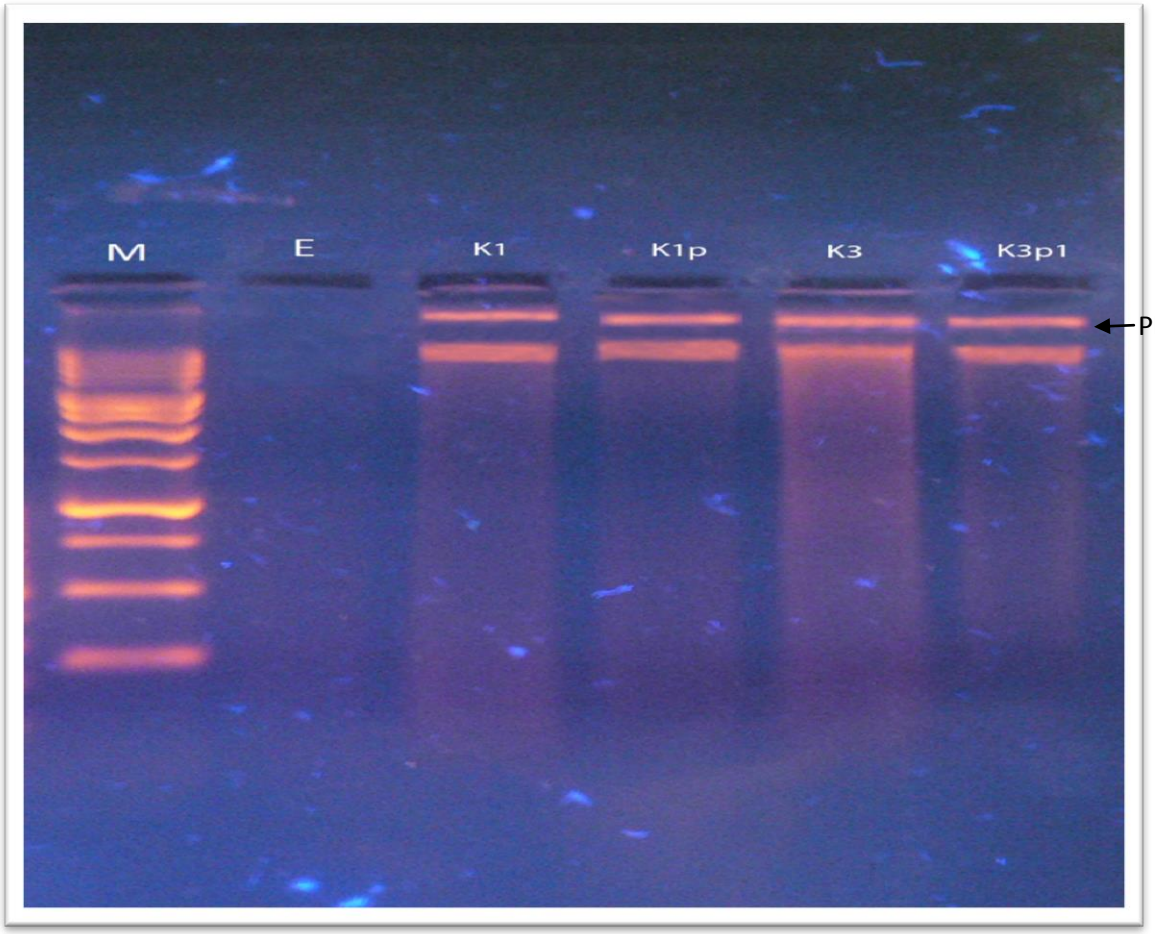
بعد أن فشلت العزلات قيد الدراسة في تحقيق الأقتران في الوسط السائل، تم تنمية العزلات على الوسط الصلب Trypticase Soya Agar لإجراء عملية الأقتران البكتيري والحصول على خلايا اقترانية، ونميت العزلات بعد ذلك على وسط إنتقائي يحوي مضادي الأمبسيلين والريفامبسين، ولم تنجح العزلات في تحقيق الإقتران وكررت هذه التجربة ثلاث مرات وعلى الرغم من ذلك لم يتم الحصول على خلايا اقترانية. وربما يكون السبب ايضا لقلة التماس بين الخلايا الواهبة والمستلمة في التخافيف العشرية.

C: الأقتران البكتيري في الوسط الصلب (طريقة Miller,1972) :

لقد أُختيرت هذه الطريقة بعد أن فشلت العزلات قيد الدراسة في تحقيق الأقتران بالطرق السالفة الذكر وتعتمد هذه الطريقة على التماس المباشر بين الخليتين الواهبة والمستلمة، إذ تم نقل المستعمرات النامية من وسط نقيع القلب والدماغ الصلب مباشرة الى وسط يحتوي على مضادي الأمبسيلين والريفامبسين لمنع ظهور العزلات الواهبة والسماح للعزلات المستلمة بالنمو إذا تمكنت من التعبير عن عامل المقاومة الذي جرى إنتخابه .

أظهرت نتائج الدراسة الحالية نجاح 18 عملية أقتران من أصل 18عزلة وبنسبة 100% وكان هناك تشابهاً في نسق البلازميدات العائدة للخلايا الأصلية والأقترانية وقد أنتقلت جميع البلازميدات من الخلايا الأصلية للعزلات (Kpn46, Kpn112) الى الخلايا الأقترانية والواضح محتواها البلازميدي في الشكل (4-13). اشار Frifelder(1987) ان وجود البلازميدات المنتقلة ذاتيا يسهل انتقال البلازميدات غير الاقترانية بشرط احتواء الاخيرة على الجينات المشفرة للانزيمات المتخصصة بعمل قطع في احد الشريطين، ويطلق على هذه العملية

بالتحريك(Mobilization)، وهدا ما يفسر انتقال جميع البلازميدات الكبيرة منها والصغيرة من الخلايا الواهبة الى الخلايا المستلمة.



شكل (4-13): المحتوى البلازميدي للخلايا الواهبة (*K.pneumoniae*) والمستلمة (*E.coliMM294*) والخلايا المقترنة، تركيز الهلام 0.7%، 75 فولت / سم لمدة 90 دقيقة .

K1 : يمثل المحتوى البلازميدي للعزلة Kpn46

K1p : يمثل المحتوى البلازميدي للعزلة المقترنة Kpn46 مع السلالة القياسية

K3 : يمثل المحتوى البلازميدي للعزلة Kpn112

K3p1 : يمثل المحتوى البلازميدي للعزلة المقترنة Kpn112 مع السلالة القياسية

E : المحتوى البلازميدي للسلالة القياسية *E.coli* MM294

M : يمثل الدليل الحجمي (1000 bp) .

قد يُعزى سبب نجاح هذه الطريقة الى التماس المباشر بين الخليتين الواهبة والمستلمة إذ تمت هذه الطريقة بدون عمل أي تخافيف ، أو أحتمال كون احدى نوعي البلازميدات في الخلايا الواهبة غير أقترانية ولكنها متحركة فأنتقلت الى الخلايا الواهبة بوجود بلازميدات إقترانية في الخلية نفسها بعملية تسمى Donation، أو قد تكون البلازميدات غير أقترانية وغير متحركة الوقت نفسه وهنا لاتستطيع الأنتقال إلا بوجود بلازميدات تتحد معها بعملية تدعى Conduction (المرجاني، 2011).

15.4 إنتقال صفة إنتاج أنزيمات البيتا لاكتاميز :

تم التحري عن إنتقال صفة إنتاج أنزيم البيتا لاكتاميز في الخلايا الأقترانية وظهرت صفة إنتاج هذا الأنزيم في 15 عزلة من 18 عزلة إقترانية وبنسبة (83.3%)، جدول(4 –18).

وهذا يؤكد أن صفة إنتاج هذا الأنزيم محمولة بلازميديا وتتفق مع ما أشار إليه الباحثون (Poirel *et al.*, 2000) بأن أغلب أنزيمات البيتا لاكتاميز المكتشفة حديثاً تقع تحت سيطرة بلازميدات إقترانية كبيرة الحجم تُشفر للمقاومة المتعددة فضلاً عن مسؤوليتها لمقاومة المعادن الثقيلة. تم إجراء فحص التحري على أنزيمات البيتا لاكتاميز الواسعة الطيف، إذ أستطاعت 9 عزلات وبنسبة 50% من إنتاج هذا الأنزيم مما يشير الى أن صفة إنتاج هذا الأنزيم قد تكون بلازميدية أو قد تكون محمولة على الكروموسوم .

تم التحري عن إنتاج الخلايا الأقترانية لأنزيمات Metallo β–Lactamase إذ أستطاعت 10 عزلات وبنسبة 55.6% من إنتاج هذا الأنزيم مما يشير الى أن صفة إنتاج هذا الأنزيم قد تكون بلازميدية أو قد تكون محمولة على جينات كروموسومية.

16.4 إنتقال صفة مقاومة المضادات الحيوية والمعادن الثقيلة:

أظهرت نتائج هذه الدراسة إنتقال صفة مقاومة أغلب المضادات الحيوية والمعادن الثقيلة من الخلايا الواهبة التي تملك صفة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة المستخدمة قيد الدراسة الى الخلايا المستلمة المتمثلة بالسلالة القياسية والحساسة لأغلب المضادات الحيوية عدا مضاد الريفامبسين المقاومة له، (جدول 4 – 18).

جدول 4-18 : إنتقال المحددات المسؤولة عن مقاومة المضادات الحيوية والمعادن الثقيلة وأنزيمات البيتا لاكتاميز عن طريق الأقتران البكتيري

رقم العزلة	مظاهر المقاومة للخلايا الواهبة	مظاهر المقاومة للخلايا المستلمة
Kpn7	AMP.,Cb.,PRL.,Ce.,AMC.,TMP.,FT., βLac$^-$، (Cu,Ag)	AMP.,Cb.,PRL.,Ce.,FT βLac$^-$, (Cu)
Kpn13	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,CFM.,ATM.,CN.,TE.,FT.,TMP βLac$^+$, (Zn,Cu)	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,CFM.,ATM.,TE.,TMP βLac$^+$, (Zn)
Kpn16	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,ATM.,AMC.,CN.,TE.,TMP.,FT βLac$^+$, (Zn,Co)	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,ATM.,AMC.,TMP.,FT βLac$^-$, (Zn,Co)
Kpn17	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,CFM.,CN.,TMP βLac$^+$, (Zn,Co)	AMP.,Cb.,PRL.,CFM.,CN βLac$^-$, (Zn,Co)
Kpn18	AMP.,Cb.,PRL.,Ce.,AMC.,CN,cl βLac$^+$, (Zn)	AMP.,Cb.,PRL.,AMC.,CN,cl βLac$^+$, (Zn)
Kpn26	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,CFM.,ATM.,AMC.,TE βLac$^+$, (Zn)	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,ATM.,AMC. βLac$^-$, (Zn)
Kpn28	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,AMC.,TE., TMP βLac$^+$, (Co)	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,AMC., TMP βLac$^+$, (Co)
Kpn29	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,CFM.,ATM.,CN.,FT.,AMC βLac$^+$, (Cu,Ag,Hg)	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,CFM.,AMC βLac$^+$, (Cu)
Kpn46	AMP.,Cb.,PRl.,CL.,Ce.,Cfm.,ATM.,AMC.,AK.,CN.,Cf.,C.,TE.,TMP.,FT βLac$^+$, (Zn,Cu,Co,Ag,Hg)	AMP.,Cb.,PRl.,CL.,Ce.,Cfm.,ATM.,AMC.,Cf.,C.,TE.,TMP.,FT βLac$^+$, (Zn,Cu.,Ag,Hg)
Kpn108	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,CFM.,CN., AMC.,TE., βLac$^+$, (Co)	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,CFM., AMC., βLac$^+$, (Co)
Kpn111	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,ATM.,AMC.,CN.,Cf.,TE.,TMP βLac$^+$, (Zn)	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,AMC.,CN.,TMP βLac$^-$, (Zn)
Kpn112	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,CFM.,ATM.,CN.,TE.,TMP.,AMC.,C.,Cf βLac$^+$, (Cu,Co,Zn,Ag,Hg)	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,CFM.,ATM.,CN.,TE., TMP.,AMC.,Cf βLac$^+$, (,Co,Zn,Ag,Hg)
Kpn114	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,CFM.,ATM.,CN.,TE.,TMP.,AMC.,FT.,Cf.,AK βLac$^+$, (Cu,Co,Zn,Ag,Hg)	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,CFM.,ATM.,TMP.,AMC.,Cf. βLac$^+$, (Cu,Co,Zn)
Kpn117	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,CN.,TE., TMP.,AMC.,FT.,Cf βLac$^+$, (Cu,Co,Zn,Ag,Hg)	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,CN., FT βLac$^+$, (Cu,Co,Zn,Ag)
Kpn120	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,AMC.,TE., TMP.,FT.,ATM βLac$^+$, (Ag)	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,AMC.,TE., TMP.,ATM βLac$^+$, (Ag)
Kpn126	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,Cfm.,ATM.,AMC.,AK.,CN.,Cf.,TE.,TMP.,FT βLac$^+$, (Zn,Cu)	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,Cfm.,AMC.,TE.,TMP.,FT βLac$^+$, (Zn,Cu)
Kpn127	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,AMC.,CN.,TE.,TMP.,Cfm βLac$^+$, (Zn,Cu)	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,TMP βLac$^+$, (Zn,Cu)
Kpn128	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,.,ATM.,CN.,TMP.,AMC.,FT., AK βLac$^+$, (Co,Zn,Hg)	AMP.,Cb.,PRL.,Ce.,.,ATM.,AMC. βLac$^+$, (Co,Zn)

إن عدم إنتقال بعض المحددات المسؤولة عن المقاومة الى البكتريا المستلمة قد يعزى لكون تلك المحددات قد تكون محمولة على كروموسوم، أو أن بعض العزلات تمتلك بلازميدات إقترانية فقدت الجينات الخاصة بالأنتقال نتيجة حصول طفرات وراثية تفقد البلازميد الموقع المحدد لعمل الأنزيمات القاطعة مما يؤدي الى فشله في تحفيز الدنا للأنتقال (Frifelder, 1987).

يلاحظ من الجدول (4 – 19) إن أعلى نسبة إنتقال لمقاومة المضادات الحيوية كانت للأمبسيلين، والكاربنسلين، والببراسيلين بنسبة 100%، في حين كانت أقل نسبة مقاومة كانت للجنتامايسين وبنسبة 35.7%، وتتفق مع ما أشار إليه (Al-Charrakh[c] *et al.*,2011) الى أن انتقال صفة مقاومة الجنتامايسين في الخلايا المقترنة لم يكن واضحاً وعزى سبب ذلك الى أن مقاومة هذا المضاد قد تكون كروموسومية الموقع، وكانت أعلى نسبة إنتقال للمعادن الثقيلة لمعدن الزنك إذ بلغت نسبة الأنتقال 100%، وأقل نسبة إنتقال كانت لمعدن الزئبق وبنسة 16.6%. وتتفق مع ما أشار إليه (Rouch *et al.*, 1995) الى ان بعض انواع المقاومة للمعادن الثقيلة مثل الزئبق تكون محمولة على جينات كروموسومية.

لاحظ (Baron *et al.*,1999) ان الجينات المسؤولة عن مقاومة المعادن الثقيلة تكون محمولة على بلازميدات أو جينات قافزة، وأن هذه البلازميدات في بعض الحالات تحمل جينات مقاومة لبعض المضادات كالبنسيلين والكاربنسيلين والببراسيلين والتي لها القدرة على الأنتقال من خلية الى أخرى بوساطة الأقتران البكتيري (Conjucation) أو التنبيغ (Transduction) .

جدول 4-19 : يبين نسبة إنتقال المقاومة للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة خلال عملية الأقتران البكتيري

الصفة المظهرية لمقاومة المضادات البكتيرية والمعادن الثقيلة	عدد الخلايا الواهبة الحاملة للصفة	إنتقال الصفة الى الخلايا المستلمة	النسبة المئوية للأنتقال
Ampicillin	18	18	%100
Carbencillin	18	18	%100
Piperacillin	18	18	%100
Cephalexin	18	17	%94.4
Cefotaxime	16	14	%87.5
Cefexime	11	9	%81.2
Aztreonam	9	6	%66.7
Augmentin	16	13	%81.3
Amikacin	4	0	0
Gentamycin	14	5	%35.7
Ciprofloxacin	6	3	%50
Chloramphenicol	2	1	%50
Tetracyclin	13	5	%38.5
Trimethoprim	14	11	%78.6
Nitrofurantion	10	5	%50
Cobalt	10	9	%90
Copper	8	7	%87.5
Mercury	6	1	%16.7
Silver	7	5	%71.4
Zinc	13	13	%100

ملحق (1) : إستمارة إستبيان المعلومات الخاصة بالمرضى .

1- رقم العزلة .

2- أسم المريض:

3- العمر :

4- الجنس:

5- نوع الإصابة:

6- تاريخ أخذ العينة:

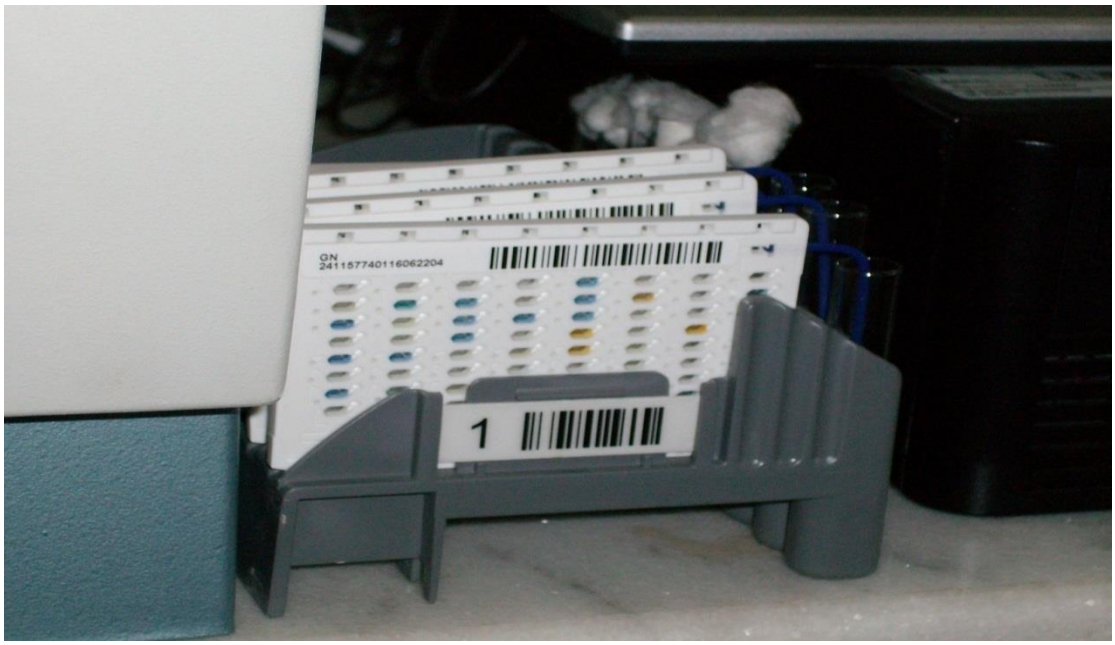
7- الدواء المستخدم خلال الإصابة:

ملحق (2) : أماكن عزل العينات من مستشفيات : بعقوبة العام , الطواريء الجراحية , والأستشارية .

	عــدد العينــات (206)			
نوع العينة	م. بعقوبة العام	الاستشارية	الطوارئ الجراحية	المجموع
الجروح	30	–	40	70
الحروق	56	–	–	56
القشع	20	30	7	57
الإدرار	13	–	10	23

ملحق (4) جهاز VITEK 2 المستعمل لتشخيص البكتريا

ملحق (5) أشرطة التشخيص بجهاز VITEK 2 والمكون من 64 اختبار كيموحيوي



الاستنتاجات

الاستنتاجات :

1- تعد بكتريا *Klebsiella pneumonia* من المسببات المهمة لالتهابات المجاري البولية، وأخماج الجروح، والحروق، والالتهابات التنفسية الحادة في مستشفى بعقوبة العام، والطوارىء الجراحية ، والاستشارية في مدينة بعقوبة .

2- احتوت العزلات جميعها على عدد من عوامل الضراوة مثل المحفظة، والقابلية عل إنتاج أنزيم اليوريز، والغشاء الحيوي وبنسبة 100%.

3- احتواء معظم العزلات على أنزيمات البيتا لاكتاميز الأعتيادية، وأحتواء بعض العزلات على أنزيمات البيتا لاكتاميز واسعة الطيف وأنزيمات الميتالو بيتا لاكتاميز .

4- لوحظ أن المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية كانت شائعة بين العزلات المحلية من بكتريا *K.pneumoniae* قيد الدراسة.

5- إن مضادي Imipenem، Chloramphenicol هما أكثر المضادات الحيوية التي أظهرت جميع العزلات قيد الدراسة الحساسية لهما.

6- أظهرت العزلات قيد الدراسة تحمل للمعادن الثقيلة وبتراكيز مختلفة .

7- وجود علاقة بين قابلية تحمل العزلات قيد الدراسة للمعادن الثقيلة مع مقاومة تلك العزلات للمضادات الحيوية .

8-المحددات الوراثية المشفرة لإنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز، والبيتالاكتاميز الواسعة الطيف، وأنزيمات الميتالوبيتالاكتاميز قد تكون بلازميدية أو قد تكون محمولة على جينات كروموسومية.

9- تعد طريقة الأقتران بالوسط الصلب وبدون عمل تخافيف لبكتريا *K.pneumoniae* من أفضل طرائق الأقتران لهذه البكتريا .

التوصيـــات

1- ضرورة إجراء دراسة لعزل بكتريا *K.pneumoniae* من وحدات العناية المركزة وأجهزة القثطرة البولية، وأجهزة الغسيل الكلوي، وغيرها من الأجهزة الطبية لمعرفة مدى إنتشار ووبائية هذه البكترية في أسطح هذه الأجهزة وعليها .

2- دراسة إنتشار أنزيمات الميتالوبيتالاكتاميز في الأنواع البكتيرية المختلفة وتحديد النسق التقطيعي للبلازميدات المشفرة لها .

3- إجراء دراسات موسعة عن عوامل الضراوة المهمة لهذه البكتريا من الناحية الوراثية بأستخدام تقنية (Polymerase Chain Reaction) PCR لتحديد وبائية هذه البكتريا .

4- إجراء دراسات موسعة على مضاد Imipenem وأمكانية أستخدامه بوصفه علاجاً فعال ومختاراً لعلاج الأصابات الناتجة عن بكتريا *K.pneumoniae*.

5 – لإنجاح عملية الإقتران البكتيري يوصى بأستخدام مركبات كيميائية ذات خصوصية عالية لإزالة المحفظة من بكتريا *K.pneumoniae* التي تعد من المعوقات الرئيسة لحصول عملية الإقتران مع الأجناس البكتيرية الأخرى .

ملحق (3) النسبة المئوية لمقاومة عزلات *K.pneumonia* قيد الدراسة لبعض المضادات الحيوية

النسبة المئوية للعزلات المقاومة %	عدد المضادات التي قاومتها العزلات	FT	TMP	TE	C	CF	CN	AK	AMC	IMP	ATM	CFM	Ce	CL	PRL	Cb	AMP	رقم العزلة
43.8%	R=7 S=9	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	R	R	R	Kpn7
68.8%	R=11 S=5	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	Kpn13
68.8%	R=11 S=5	R	R	R	S	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	Kpn16
43.8%	R=7 S=9	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R	R	Kpn17
43.8%	R=7 S=9	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	Kpn18
50%	R=8 S=8	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R	R	R	R	Kpn23
56.3%	R=9 S=7	S	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	Kpn26
50%	R=8 S=8	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	Kpn28
56.3%	R=9 S=7	R	S	S	S	S	R	S	R	S	R	R	S	R	R	R	R	Kpn29
93.8%	R=15 S=1	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	Kpn46
43.8%	R=7 S=9	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	Kpn47
37.5%	R=6 S=10	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	R	R	Kpn101
50%	R=8 S=8	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	Kpn107
56.3%	R=9 S=7	S	S	R	S	S	R	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	Kpn108

68.8%	R=11 S=5	S	R	R	S	R	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	Kpn111
81.3%	R=13 S=3	S	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	Kpn112
87.5%	R=14 S=2	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	Kpn114
68.8%	R=11 S=5	R	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	Kpn117
62.5%	R=10 S=6	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	Kpn120
87.5%	R=14 S=2	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	Kpn126
62.5%	R=10 S=6	S	R	R	S	S	R	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	Kpn127
68.8%	R=11 S=5	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	Kpn128

S: Sensitive **R: Resistance**

ملحق (3) النسبة المئوية لمقاومة عزلات *K.pneumonia* قيد الدراسة لبعض المضادات الحيوية

النسبة المئوية للعزلات المقاومة %	عدد المضادات التي قاومتها العزلات	FT	TMP	TE	C	CF	CN	AK	AMC	IMP	ATM	CFM	Ce	CL	PRL	Cb	AMP	رقم العزلة
43.8%	R=7 S=9	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	R	R	R	Kpn7
68.8%	R=11 S=5	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	Kpn13
68.8%	R=11 S=5	R	R	R	S	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	Kpn16
43.8%	R=7 S=9	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R	R	Kpn17
43.8%	R=7 S=9	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	Kpn18
50%	R=8 S=8	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R	R	R	R	Kpn23
56.3%	R=9 S=7	S	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	Kpn26
50%	R=8 S=8	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	Kpn28
56.3%	R=9 S=7	R	S	S	S	S	R	S	R	S	R	R	S	R	R	R	R	Kpn29
93.8%	R=15 S=1	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	Kpn46
43.8%	R=7 S=9	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	Kpn47
37.5%	R=6 S=10	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	R	R	Kpn101
50%	R=8 S=8	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	Kpn107
56.3%	R=9 S=7	S	S	R	S	S	R	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	Kpn108

68.8%	R=11 S=5	S	R	R	S	R	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	Kpn111
81.3%	R=13 S=3	S	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	Kpn112
87.5%	R=14 S=2	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	Kpn114
68.8%	R=11 S=5	R	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	Kpn117
62.5%	R=10 S=6	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	Kpn120
87.5%	R=14 S=2	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	Kpn126
62.5%	R=10 S=6	S	R	R	S	S	R	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	Kpn127
68.8%	R=11 S=5	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	Kpn128

S: Sensitive **R: Resistance**

المصـادر العربيــة

- القرآن الكريم

1- **البلــداوي**، ميسم سامي عبد الكريم (2005). دراسة التصاق ومقاومة البكتريا الهوائية المخمجة للمواد البديلة ومواد التثبيت الداخلي والخارجي المستعملة في جراحة العظام والكسور. رسالة ماجستير. كلية العلوم/جامعة بغداد.

2- **الجـيلاوي**، رباب عمران (2000) . دراسة وراثية لصفة اللزوجة في بكتريا الكليبسيلة *Klebsiella pneumonia* . أطروحة دكتوراه، كلية العلوم/ جامعة بغداد .

3- **الخفـاجي**، مروى حميد مطشر(2000) . تكوين الغشاء الحيوي بوساطة *Klebsiella pneumonia* الملوثة للمثبتات الخارجية ومقاومته للمضادات الحياة. رسالة ماجستير، كلية العلوم / جامعة بغداد.

4- **الزبيدي** ، محمد مهدي عبد المحسن (2012). دور البلازميدات في إنتاج البكتريوسين من بكتريا *Klebsiella spp* المعزولة من عينات سريرية . معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الأحيائية/ جامعة بغداد.

5- **الزعاك**، علي (1994)، البايولوجي الجزيئي لضراوة البكتريا، الطبعة الأولى، جامعة بغداد.

6- **السعدون**، صلاح مهدي حسن. (2007). دراسة وراثية وجزيئية لعزلات محلية مرضية من بكتريا *Klebsiella spp* المقاومة للمعادن الثقيلة والمنتجة لأنزيم β-Lactamase .رسالة ماجستير، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية .

7- **القصاب** ، عبد الجبارعمر و الخفاجي ، زهرة محمود . (1992) . تأثير الظروف المختلفة على الفعالية التثبيطية للعصيات اللبنية المعوية أتجاه البكتريا المعوية المسببة للأسهال . كلية العلوم الزراعية . مجلد (123) . العدد (7):18-26 .

8- **الطائي**، زهير علي شفيق (2006) . تنقية وتوصيف انزيم البيتالاكتاميز المنتج بواسطة بكتريا *Klebsiella pneumoniae* . رسالة ماجستير، معهد الهندسة الوراثية و التقنيات الاحيائية، جامعة بغداد.

9- **المرجــاني**، محمد فرج . (2011) . المضادات الحيوية المقاومة الحيوية البكتيرية للمضادات الحيوية. عمان: دار دجلة .

10- **المــلا**، حواء محمد ناصر (2003). تأثير مركبات السالسيلات في جراثيم الكلبسيلا المعزولة من إصابات سريرية مختلفة، رسالة ماجستير، كلية العلوم/الجامعة المستنصرية.

11- **النعيمي**، ابتهال محمد زاهد (2002)، الأخماج البولية عند النساء الحوامل، رسالة ماجستير، كلية العلوم/الجامعة المستنصرية.

12- **حبيب**، علاء سالم حمزة (2009). دراسة وراثية للبكتريوسين المنتج من بكتريا *Klebsiella spp* المعزولة من مصادر سريرية مختلفة . كلية العلوم/ الجامعة المستنصرية.

13- **شغيث**، فاطمة حسن (2000)، انتشار وضراوة بكتريا الكلبسيلا المعزولة من التهابات المجاري البولية في الإنسان ودراسة محتواها البلازميدي، رسالة ماجستير أحياء مجهرية، كلية العلوم/الجامعة المستنصرية.

المصادر الأجنبية

A

* Abdul Ghafur K.(2010) , An obituary - On the death of antibiotics**. *J. of the association of physicians of India***.;58:143-44.

*Ahmed, V.U.; Hussain, J.; Hussain, H.; Jassbi, A.R.; Ullah, F.; Lodhi, M.A.; Yasin, A. and Choudhary, M.I. (2003). First natural urease inhibitor from *Euphorbia decipiens*. ***Chem. Pharm. Bull***. 51(6): 719-23.

*Al-Charrakh[a],A .H .; Yousif ,S .Y .and Al- Janabi ,H .S.(2011). Antimicrobial spectrum of the action of bacteriocins from *Klebsiella* isolates from Hilla/Iraq **. *J. Microbial*** .Vol . 2,Nu .5,:1-11.

*Al-Charrakh[b],A.H. , Alwash,M.S. and Al-Husaini,W.K (2011); Antibiotic Susceptibility of Enterobacteria Isolated from one Hospital in Hilla,Iraq .***J***. *of* ***Babylon University*** /Pure and Applied Sciences / No.(1)/Vol.(19).

*Al-Charrakh[c], A. H. , Yousif, S. Y.and Al-Janabi, H. S. (2011) ; Occurrence and detection of extended-spectrum β-lactamases in *Klebsiella* isolates in Hilla, Iraq. ***Afri. J. of Biotechnology*** Vol. 10 (4), pp. 657-665.

*Al-Agamy, M. H. (2012) ; Genetic basis of cefotaxime resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Cairo **. *Afr. J.of Microbiology Research*** Vol. 6(1), pp. 20-27.

*Atlas R.M.; Brown,A.E.; and Parks,L.C.(1995) Laboratory Manual Experimental Microbiology. 1th ed. Mosby Yearbook, Inc. P: 888

*Arakawa, Y.; Ohta, M.; Kido,N.; Mori,M.; Ito,H.; Komatsu,T.; Fujti,Y.; and Kato, N.(1984) Chromasomal β– Lactamase of *Klebsiella oxytoca*, anew class A enzyme that hydrolyzes broad spectum β – Lactam antibiotic**. *Antimicrob. Agents Chemother***. 33(1): 63 – 70.

*Aruna, K. and Mobashshera, T. (2012) ; Prevalence of extended spectrum beta-lactamase
production among uropathogens in south mumbai and its antibiogram pattern. ***EXCLI .J.****;pp 363-372.*

*Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Smith, J. A.; Seidman, J. D. & Struhi, K. (1987). Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, Inc. New York.

B

*Baron, E.J.; and Finegold, S.M. (1990) Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 8th ed. The C.V. Mosby company, St. Louis, Missouri.

*Baron, E.J.; Peterson, L.R. & Finegold, S.(1999). Diagnostic Microbiology. 9th ed. Baily and Scott's. The C.V. Mosby company.

*Barnhart, C. ; Campell, R. ; La Rosa, L.A. ; Marr, A.M. ; Morgan, A. and Van Bercom, D. (2002). Mechanisms of aminoglycosides resistance. http: //www. Uphs. Upenn. Edu/bugdrug/antibiotic manual/ aminoglycoside. Resistance. Htm.

*Bauer, S.W.; Kirby, W.M.; Sherris, J.C. and Truck, M.D. (1996) . Antibiotic susceptibility testing by standardized single dose method. ***American. J.clinical path.***

* Benenson,S. , Temper,V. , Cohen,M.J. , Schwartz,C. , Carlos Hidalgo-Grass,C. and Colin Block,C.(2011); Imipenem Disc for Detection of KPC Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* in Clinical Practice. J***.of clinical microbiology****,* Vol. 49, No. 4. pp. 1617–1620

-

*Benett, P.M. and Chapro, L. (1993). Molecular basis of β – Lactamases induction in bacteria. ***Antimicrobil. Agents Chemother.*** 37: 153 – 158.

*Bergey, D.H., John, G.H. (1994); Bergey's manual of deter-minative biology, William and Wilkins, 9th ed., Chapter 4, Pp. 181-186.

*Bhalerao, D. S., Roushani, S., Kinikar, A. G. and Akhter, I. (2010) ; Study of Metallo-beta lactamase producing Pseudomonas aeruginosa in Pravara Rural Hospital. ***Pravara Med Rev***;p.1-5

*Bhattacherjee,J.W.; Pathak,S.P.; and Gaur,A.(1988) Antibiotic resistance & metal tolerance of coliform bacteria isolated from Gomati river water at Lucknow city**. J. Gen. Appl. Microbiol***. 34: 391 – 399

*Bistue, A. J. C. S. , Birshan, D. , Tomaras, A. P. , Dandekar, M. ,Tran, T. , Newmark, J. , Bui, D. , Gupta, N. , Hernandez, K. , Sarno, R. , Angeles Zorreguieta, A. , Actis, L. A. , Marcelo E. and Tolmasky, M. E. (2008) ; Klebsiella pneumoniae Multiresistance Plasmid pMET1:Similarity with the Yersinia pestis Plasmid pCRY and Integrative Conjugative Elements. PLoS ONE 3(3): doi:10.1371 /***journal. pone***. 0001800. Vol. 3 . pp.1-9

*Blackburn , D.(2010). The Production of the *E. coli* common pilus by Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* . MSC .Thesis .College of Science .University of Florida p.1-6

*Bordi, C. and De Bentzmann. S. (2011) ; Hacking into bacterial biofilms: a new therapeutic challenge**. Annals of Intensive*** Care , 1:19.p.2-8

*Borkow, G. and Gabbay, J. (2005) ; Copper as a Biocidal Tool. ***Current Medicinal Chemistry***, 12, 2163-2175

*Bratu, S. , Landman, D. , Alam M, Tolentino, E. and Quale, J. (2005) ; Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter* spp. from Brooklyn,New York**. Antimicrob Agents Chemother*** ;49:776–778.

*Brisse S, Fevre C, Passet V, Issenhuth-Jeanjean S, Tournebize R, , Diancourt, L. and Patrick Grimont, P. (2009) ; Virulent Clones of *Klebsiella pneumoniae*: Identification and Evolutionary Scenario Based on Genomic and Phenotypic Characterization. PLoS ONE 4(3): e4982. doi:10.1371/***journal.pone***.p.1-7

*Brooks ,G.F. ; Butel, J.S. and Morse ,S. A. (2004). *Klebsiella* in : Jawetz , Melenik and Adelberg's Medical Microbiology , 23rd ed .The

McGraw –Hill Companies .Appleton and Lange . New York.

*Brooks , G. F.; Butel , J. S.;Carroll, K. C. and Morse, S. A. (2007) . Jawetz , Melinick , J.L. and Adlebergs Medical Microbiology , 24th ed. A lange medical book.

*Bruins, M. R. , Kapil, S. and Oehme, F. W. (2000) ; Microbial resistance to metal in the environment . *Ecotoxicol. Environ. Saf.* , 45, 198.

*Burnely,L-E.(2000); Heavy Metal Resistance in the Genus *Gluconobacter*. Thesis Submitted to the faculty of Virginia Tech in partial fulfillment to the requirements for the degree of Master of Science in Biology.

C

*Cartera, E.L. , Fluggaa,N. ,Boerb J.L., Mulrooneya, S. B. and Hausinger, R. P.(2009) ; Interplay of metal ions and urease.Published in final edited form as: ***Metallomics.*** 2009 January 1; 1(3): 207–221.

*Castillo-Zacarías, C.J ,.Suárez-Herrera, M.A , Garza-González, M. T. , Sánchez-González, M. N. and López-Chuken, U. J. (2011) ; Biosorption of metals by phenol-resistant bacteria isolated from contaminated industrial effluents. ***Afri .J.of Microbiology Research*** Vol. 5(18), pp. 2627-2631.

* Charan, J., Mulla, S. , Ryavanki, S. and Naresh Kantharia, N. (2012) ; New Delhi Metallo – beta lactamase – 1 containing *Enterobacteriaceae*: Origin, Diagnosis, Treatment and Public health concern**. *pan african medical journal***.;p.1-7

*Christopher, R.W.; Edwards, I.; and Bonchier, I. (1991). Antibiotic Chemotherapy. P: 193-99 In: Davidson's Principles and Practice of Medicine. (16th) ed. Churchill.

* 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., (2008) ; The Major Surface-Associated Saccharides of *Klebsiella pneumoniae* Contribute to Host Cell Association. PLoS ONE 3(11): ***/journal.pone***. p.1-10

*Cloeckaert, A. , Baucheron, S. and Chaslus-Dancla, E. (2001) ; Nonenzymatic Chloramphenicol Resistance Mediated by IncC Plasmid

R55 Is Encoded by a *floR* Gene Variant. ***Antimicrobial agents and chemotherapy***, Aug. Vol. 45, No. 8, p. 2381–2382.

*Collee , J. G. ; Fraser , A. G. ; Marmion , B. P. and Simmons , A. (1996) . Mackie and McCartney practical medical microbiology . 14th ed. Churchill Livingston . P.173-174 .

*Cucarella, C. ; Tormo, M.A. ; Ubed, C. ; Trotonda, M.P. ; Monzon, M. ; Peris, C. ; Amorena, B. ; Lasa, I. and Penades, J.R. (2004). Role of Biofilm-Associated Protein Bap in the Pathogenesis of Bovine *Staphylococcus aureus*. Infect. ***Immun.*** 72(4) : 2177-2158.

*Cursino,L.; Smarda,J.;Chartone,E. & Nascimento,A. (2002). Recent updated aspects of colicins of *Enterobacteriaceae.* ***Braz. J.Microbiol***., 33:196-217.

*Cvitkovitch, D.G. ; Li, Y.H. and Ellen, R.P. (2003). Quorum Sensing and Biofilm Formation in *Streptococcal Infections*. ***J.Clin. Invest***. 112:1626-1632.

D

*Dalhoff, A.; Nasu, T. and Okamoto, K. (2003). Beta-lactamase stability of faropenem. Chemotherapy. Sep. 49(5): 229-36.

* Damian, M. , Usein, C. , Palade, A. , Ceciu, S. and Cosman, M. (2009) ; Molecular Epidemiology and Virulence Characteristics of *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated from Hospital-Associated Infections. ***The Open Epidemiology. J***., , p, 69-78

*Dionisio,F. ;Matic,L.; Radman,M.; Rodringuse,O.R. & Toddei,F. (2002).Plasmid spread very vast in heterogeneous bacterial communities .Genetics,162:1525-1532.

*Dioro, C.; Cai, j.; Marmor, j.; Shinder, R. & Durbow, M. S. (1995). An *Escherichia coli* chromosomal ars operon homolog is functional in arsenic detoxification and is conserved in gram – negative bacteria. ***J. Bacteriol***. 177: 2050 –2056.

*Doebbeling, B.N. (1993). Epidemics : identification and management .. In : (Weznel, R.P. ed). Prevention and Control of Nosocomial Infections.2nd edition. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md. P. 177-206

*Donlan, R.M. and Costerton, J.W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms**. Clin. Microbiol. Rev.*** 15:167-193.

*Douglas,F.(2008).Colifroms .Medical Microbiology Book . USA.

E

* Egbebi, A. O. and Famurewa, O. (2011) ; Heavy Metal Resistance among *Kelbsiella* Isolates in Some Parts of Southwest, Nigeria**. Asi .J.of Medical Sciences*** 3(5): 183-185

*El Kholy, A. A. , Gomma, H. E. , Younan, M. A. , Thabet, E. H. , Haleim, M. M. A. , El Anany, M. G.andHendeya, A. A. S.(2011) ; Extended spectrum b-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains in a pediatric teaching hospital in Egypt**. Medical Research. J.***, Vol 10 No 1:27–31.,

* Elouennass, M. , Zohoun, A. , El Ameri, A. , Alem, N. , Kasouati, J. , Benlahlou, Y. , El Yaagoubi, I. , Frikh, M. , Lemnouer, A. and Benouda, A. (2012) ; In vitro activities of ertapenem and imipenem against clinical extended spectrum beta-lactamase-producing *enterobacteriaceae* collected in military teaching hospital mohammed v of rabat. hindawi publishing Corporation. Interdisciplinary perspectives on infectious diseases., p.1-5

F

*Fluit, A.C. , Visser, M.R. and Schmitz, F.J.(2001).Molecular detection of antimicrobial resistance. ***Clinical Microbiology Reviews***. Oct. 836-71.

*Forbes, B.A. , Sahm, D.F. and Wessifeld, A.S. (2002) . Bailey and Scotts' diagnostic microbiology . 9th ed . Mosby . U.S.A. Vol.1:509 .

*Forrest, A.; Weir, M. and Plaisance, I.K. (1988) Relation between renal function and disposition of oral ciprofloxacin**. J. Antimicrob. Agents Chemother***.: 1537-1540.

*Freeman, D.J., Falkiner,F.R. and Keane,C.T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci**. J. Clin. Pathol***. 42:872-874.

*Frifeder,D.(1987) Molecular biology. 2nd ed. Yones and Barttett. Boston.

G

* García-Sureda, L. , Juan, C. , Dome´nech-Sa´nchez, A. , and Albertí, S. (2011) ; Role of *klebsiella pneumoniae* lamb porin in antimicrobial resistance. ***antimicrobial agents and chemotherapy***, vol. 55, no. 4 , p. 1803–1805

* Ghafourian, S. , Sekawi, Z. , Sadeghifard, N. , Mohebi, R. , Neela, V. K. , Maleki, A. , Hematian, A. , Rahbar, M. , Raftari, M. and Ranjbar, R. (2011) ; The Prevalence of ESBLs Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Some Major Hospitals, Iran. ***The Open Microbiology. J.,*** *5*, 91-95

*Gillor ,O., Nigro,L.M. and Riley, M .A .(2005). Genetically Engineered Bacteriocins and their Potential as the Next Generation of Antimicrobials .Genetically Engineered Bacteriocins . Vol .15:1-9 .

*Götz, F. 2002. *Staphylococcus* and biofilms. Mol. ***Microbiol.*** 43(6):1367-1378.

*Greenwood, D. , Slak, R. , Peutherer, J. and Barer, M. (2007) ; Medical microbiology. 7th ed. Churchill Livingstone Elsevier. Part 3.

*Guilfoile, P. G. , Alcamo, E. and Heymann, D. (2007) ; Antibiotic – Resistance bacteria. Chelsea House Publishers. pp. 53-62.

*Gupta, A. , Phung, L.T. , Taylor, D. E. and Silver, S. (2001) ; Diversity of silver resistance genes in IncH incompatibility group plasmids. ***Microbiology,*** 147, 3393–3402

*Gutteridge. J.M. C ; and Halliwell. B.(1990) The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. ***Trends Biochem. Sci***. 15: 129 — 135.

H

*Haefeli,C.; Franklin,C.; and Hardy, K.C.(1984) Plasmid determined silver resistance in Pseudomonas stutzeri isolated from a silver mine. ***J. Bacteriol***. 158: 389—392.

*Han, J. S. , Jang, I-Y. , Ryu, H-S.and Kim, W-Y.(2010) ; Similarity with the Yersinia pestis Plasmid pCRY and Integrative Conjugative Elements. ***J. Korean Soc***. Appl. Biol. Chem. 401-406

* Harajly, M. , Khairallah, M-T , Corkill, J. E. , Araj, G. F. and Matar, G. M. (2010) ; Frequency of conjugative transfer of plasmidencoded ISEcp1 - blaCTX-M-15 and aac(6′)-lb-cr genes in *Enterobacteriaceae* at a tertiary care center in Lebanon - role of transferases **.** ***Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials***, 9:19

*Harley, J.P. & Prescott, L.M . (1996) .Labratory Exercises in Microbiology . 3rd ed .McGraw –Hill publishing company . New York.

* Hassan, A. , Usman, J. , Kaleem, F. , Omair, M. , Khalid, A. and Iqbal, M. (2011) ; Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates**.** ***Braz J Infect Dis*** ; 305-311

* Ho,J-Y. , Lin,T-L. , Li,C-Y. , Lee,A. , Cheng,A-N. , Chen,M-C. , Wu,S-H. , Wang,J-T. , Li,T-L. and Tsai,M-D.(2011); Functions of Some Capsular Polysaccharide Biosynthetic Genes in *Klebsiella pneumoniae* NTUH K-2044. PLoS ONE 6(7): doi:10.1371/***journal.pone***.p.1-6

*Hobman. J.L.: Wilson, J.R.: and Brwn, N.L..(2000) in environmental metal microb interactions (Lovley. D.R.ed) 177 — 197. ASM press, Washington DC.

*Housden, N., Loftus, S., moore, G. and Kleanthous, C.(2005). Cell enty meehauism of enzymatic bacterial colicins: Porin recruitment and the thermodynamics of receptor binding. Proc**.** ***Natl.Aced. SCI***. USA., 102 : 13849-54.

*Hsieh,P-F. , Lin,T-L. , Yang,F-L. , Wu,M-C. , Pan,Y-J. , Wu,S.H. and Wang,J-T. (2012) Lipopolysaccharide O1 Antigen Contributes to the Virulence in Klebsiella pneumoniae Causing Pyogenic Liver Abscess **.** ***journal.pone***.p.1-5

*Huang ,Y .J .; Liao , H. W .; Wu ,C .C. and Peng ,H .L.(2009). MrkF is a component of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* : 71-79.

J

*Jacoby,G.A. and Munoz —price,L.S. (2005) Mechanisms of disease the new β — Lactamases —new. ***Engl. J. Med.*** 352(4): 380 — 391.

*Jarlier, V.; Nicolas, M.; Fournier, G.; and Philippon, A. (1988). Extended broad-spectrum β-Lactamases conferring transferable resistance

to newer β-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: Hospital prevalence and susceptibility patterns. ***Rev. Infect. Dis***. 10(4): 867-78.

*Jawetz, E.; Melnick,J.; and Adelberg, E.(1982) Review of medical microbiology. 15ed.. Middle East Beirut, Lebanon

*Jaysankar D., Ramaiah N. and Vardanyan L. (2008) : Detoxification of toxic heavy metals by marine bacteria highly resistant to mercury**..*** ***Marine Biotechnology***. Vol. 10, No. 4, pp. 471-477

*Jiang, M. J. Zhao, Sh. P. and Li, J. M.(2012) ; Resistance of β-lactamase–producing *Klebsiella pneumoniae* to Imipenem with Ompk36 loss. ***Afri. J. of Microbiology Research*** Vol. 6(13), pp. 3231-3236,

K

* Karbasizaed, V. , Badami, N. and Emtiazi, G. (2003) ; Antimicrobial, heavy metal resistance and plasmid profile of coliforms isolated from nosocomial infections in a hospital in Isfahan, Iran. ***Afri. J. biotechnology*** .2(10):379-383.

*Katzung, B.G. (2001). Basic and Clinical Pharmacology. (8^{th}) ed. Lange Medical Books. McGraw-Hill. New York.

*Kayaoglu, G. & Qrstavik, D. (2004). Virulence factors of *Enterococcus faecalis*. Relationship to Endodontic disease**.*** ***Rev. Oral. Biol. Med***. ,15(5) : 308–342.

*Keynamy ,Y. and Rubinstein E. ,(2007).The changing face of *Klebsiella pneumoniae* infection in thecommunity. Int. J. Antimicrob.Agents.:385-389.

*Kfoury,J.N.S.; andAraj,G.F.(2003) Recent developments in β—Lactamases and extended spectrum β —Lactamases**.*** ***Braz. J. Microbiol***. 327: 1209 — 12 13.

*Kdurna, D.(1990). Personal communication Washington state University, Pullman, WA.

*Knapp, C. W. , McCluskey, S. M. , Singh, B. K. ,Colin D. Campbell, C. D. , Hudson, G. and Graham, D. W.(2011) ; Antibiotic Resistance Gene Abundances Correlate with Metal and Geochemical Conditions in Archived Scottish Soils. PLoS ONE /***journal.pone***.p.1-7

*Koch, A.L., (2000) Penicillin binding proteins β - Lactamase, and Lactamases: offensive, Attacks and Detersive counter measures, ***Microbiol,*** 26(4): 205-220.

*Koneman, E.W; Allen, S.D; Janda, W.M; Schreckenberger, P.C and Winn, W.C.J.(1992). Color Atlas and Textbook Of Diagnostic Microbiology. (4^{th}) ed. ***J.B.Lippincott Company***. Philadelphia.

*Kumar ,A. and Talwar ,A ,(2010). Antimicrobial Resistance Patterns of *Klebsiella spp*. Isolated from Raw Milk of Doon Valley. ***Microbiology and Molecular Biology*** .Vol .1,Nu.1,:pp.21-35.

*Kumar, V. , Sun, P. , Vamathevan, J. , Li, Y. , Ingraham, K. , Palmer, L. , Huang, J. and Brown, J. R. (2011) ; Comparative Genomics of *Klebsiella pneumoniae* Strains with Different Antibiotic Resistance Profiles. ***Antimicrobial agents and chemotherapy,*** Vol. 55, No. 9 p. 4267–4276.

L

*Lambert,O.; Michea-Hamzehpour, M.; Kohler, T.; Chau,F.; Fanrisson, F.; Dautrey, S.; and Pechere, J. (2001) Differential selection of multidrug efflux mutants by travafloxacin and ciprofloxacin in an Experimental model of *Pseudomonas aeruginosa* acute pneumonia in rats. ***Antimicrob. Agents Chemother.*** 44: 571 — 576.

*Lara,H.H. , Ayala-Nu´n˜ez,N.V. , Turrent,L.C.I. and Padilla,C.R.(2010): Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. ***World J Microbiol Biotechnol*** 26:615–621

*Laurence, D.R.; Bennett, P.N.; and Brown, M.J. (1997). Clinical Pharmacology. (8^{th})ed .Churchill Livingstone London.

*Lee, E.H.; Collatz, E.; Trias, J.; and Gutmann, L,.(1992) Diffusion of β- Lactamase antibiotics into proteoliposomes reconstituted with outer membranes of isogenic imipenem susceptible and resistant strains of *Enterobacter cloacae****. J. Gen. Microbiol***. 138(11): 2347 — 2351.

*Li,L.;and Lim,C.K.(2000). Anovcl large plasmid carrying multiple beta – Lactam resistance genesis from a *Klebsiella pneumoniae* strains***. J. Appl. Microbiol***. 88(6): 1038-1048.

*Liang,Z. , Li,L. , Wang,Y. , Chen,L. , Kong,X. , Hong,Y. , Lan,L. , Zheng,M. , Guang-Yang,C. , Liu,H. , Shen,X. , Luo,C. , Li,KK. , Chen,K.

and Jiang,H.(2011);Molecular basis of NDM-1, a new antibiotic resistance determinant.; /***journal .pone***.p1371-1376.

*Liaw, S.J. ; AI, H.C. ; HO, S.W. ; Luh, K.T. and Wang, W.B. (2000). Inhibition of virulence factor expression and swarming differentiation in *Proteus mirabilis* by *p*-nitrophenly glycerol**. J. Med. Microbiol***. 49: 725-731.

*Liu, Q. and Bender, R. A.(2007) ; Complex Regulation of Urease Formation from the Two Promoters of the *ure* Operon of *Klebsiella pneumoniae***. J. of Bacteriology,** Vol. 189, No. 21 , p. 7593–7599

*Lipuma, J.J.; Stull, T.L.; Dasen, S.E.; Pidock, K.A. and Kazeniomiski, O.M. (1989). DAN Polymorphism among *E. coli* isolated from bacteriuria Women**. *J. Infect. Dis.*** 159: 526-531.

*Livermore, D.M.; and Yuan, M.(2004) β – Lactamases and extended spectrum β – Lactamases**. *Braz. J. Microbiol***. 214:1 – 20.

*Livermore, D.M.(1995). β – Lactamases in laboratory and clinical resistance. ***Clin. Microbiol. Rev***. 8(4): 557–584

*Luders,T.;Birkemo,G.A.;Fimland,G.;Nissen-meyer, J.& Nes,L.F. (2003). Strong synergy between eukaryotic antibacterial peptide and bacteriocins from lactic acid bacteria ***.Appl.Environ.Microbiol***.,69(3):1797-1799.

M

*Macfaddin, J.F. (1979). Biochemical Test For Identification of Medical Bacteria. The Williams and Wilkins Co. U.S.A.

*Maldonado,N.C , Silva de Ruiz,C. , Cecilia,M. and Nader-Macias,M.E.(2007):A simple technique to detect *Klebsiella* biofilm-forming-strains. Inhibitory potential of *Lactobacillus* fermentum CRL 1058 whole cells and products. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology . A.Mendez-Vilas(Ed.)p.52-57

*Mandell, G.L.; Bennet, J.E.; and Dolin, R.(1995). Principles & Practice Of Infectious Diseases. (4^{th}) ed. Churchill Livingstone, London.

*Maniatis, T.; Fritsch, E.F.; & Sambrook, J.(1982) Molecular cloning

Fourth ed. Cold spring Harbor Laboratory. New York. Book.

*Martindele , 1996. The extra pharmacopeia. 31ed. Royal pharmacentical society of Great Britian.

*Martinez – Martinez, L.; Pascual, A.; and Jacoby, G.A.(1998) Quinolone resistance from a transferable plasmid. The Lancet. 351(4): 797 – 799.

*Mathur, T.; S. Singhal; S. Khan; D.J. Upadhyay; T. Fatma; and A. Rattan. 2006. Detection of Biofilm Formation among The Clinical Isolates of Staphylococci: An Evaluation of Three Different Screening Methods. ***Indian J. Med. Microbiol***. 24(1):25-29.

*Mendonça,N.R.F.D. (2009) : Molecular diversity of *bla* genes in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates, Chapter 1.

*Miller, J. H. (1972). Episome transfer: direct selection In: " experiments in Molecular Genetics ". Cold Spring Harbour Laboratory. New York. pp : 82 – 87.

*Mochon, A. B. , Garner, O. B. , Hindler, J. A. , Krogstad, P.and Ward, K. W. , Rasheed, J. K. , Anderson, K. F. , Limbago, B. M. and Humphries, R. M. (2011) ; New Delhi Metallo-β-Lactamase (NDM-1)-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Case Report and Laboratory Detection Strategies**.** ***J. Clin. Microbiol***. *vol. 49 no.* 4, p. 1667–1670

*Moellering RC. NDM-1: A cause for worldwide concern. ***New Eng J Med.*** 010;363:2377-2379.

*Montanaro, L. ; Arciola, C.R. ; Bladassari, L. and Borsetti, E. (1999). Presence and expression of collagen adhesion gene (cna) and slime production in *staphylococcus aureus* strain from orthopedic prosthesis infection. ***Biomaterials.*** 33:12-19.

*Mulrooney, S.B.; and Hausinger, R.P. (2003). Nickel uptake and utilization by microorganisms. ***FEMS Microbiology Reviews***. 27: 239-61.

*Munoz-Price, K. , L. S. , Hayden, M. K. , Karen Lolans, K. and Won, S. (2010) ; Successful Control of an Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase–Producing *K. pneumoniae* at a Long-Term Acute Care Hospital. ***infection control and hospital epidemiology*** , vol. 31, no. 4.p . 1-8.

*Murray, P.R.; Baron, E.J.; Pfaller, M.A.; Tenover, F.C. & Yolken, R.H. (1999). Manual Of Clinical Microbiology. (7th)ed. American Society Of Microbiology. Washington, U.S.A.

N

*Naas**,** T; Zerbih, M; Girlich, D.; Nordmann, P. (2003). Integration of Transposon Tn1- Encoded inhibitor resistant β -Lactamase Gene *bla*TEM-67 from *Proteus mirabilis*,, into *the Escherichia coli* chromosome***. J. Antimicrob. Chemoth.*** 47 (1): 19-20.

*Nadasy,K.; Domiati-Saad,R. & Tribble,M. (2007) . Invasive *Klebsiella pneumoniae* syndrome in north America .***Clin .Infect Dis***.,45:25-28.

*National Committee For Clinical Laboratory Standareds (2002). Perfomance Standared For Antibiotic Susceptibility Testing NCCLS. Villanova P.A.

*National Committee For Clinical Laboratory Standareds (2007) . Perfomance Standared For Antibiotic Susceptibility Testing NCCLS ; Seventeenth informational supplement . Vol. 27 No.1 M100-S17.

*Neu,H.C. (1991). Therapy and prophylaxis of bacterial infections . P:478-93. In Harrison's principals of internal medicine by Wilson,J.D.;Braundwold,E.;Martin,J.B.;Fauci,A.S.;& Root,R.(12th)ed.V1.Mac-Graw.Hill.New York.

*Nishida, K., Kunugatta, C., Uyl, T., I ligashitani, F., Hyodo, A., Unemi, N., Matti, S.N., Philips, O.A., Spevak,P., Atchison,K.P., Salama, S.M., Atwal, II., and Micetich, R.G.(1999) *In vitro in vivo* activity of SYn 2190, a nova) β — Lactamase inhibitor. Antimicrob**.** ***Agents Chemother***. 43(8): 1895 — 1900.

O

*Ochman, H.J. ; Lawrence, J.G. and Groisman, E.A. (2000) . Lateral gene transfer and the nature of bacterial innoration. Nature., 405: 299–304.

*O'Connell,M.(1984). Genetic Transfer in prokaryotes transformation, transduction and conjugation.: 2 — 13 in Advanced Molecular Genetic by publisher, A. and Timmis. K. Springer verlug — Berlin.

*Ofek, I. and Doyle, R.J. (1994). Bacterial Adhesion to Cells and Tissues. Chapman and Hall, Ltd., London, United Kingdom.

* Özçelik, B. , Orhan, D. D. , Özgen, S. and Ergun, F. (2008) ; Antimicrobial Activity of Flavonoids against Extended-Spectrum -Lactamase (ES-L)-Producing *Klebsiella pneumonia*.Tropical**. *J.of Pharmaceutical Research*,**; 7 (4): 1151-1157

P

*Pai, H.; Kim, J.W.; Kim, J.; Lee, H.; Choe, K.W.; & Goton, N.(2001). Carbapenem Resistance Mechanisms In *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isoletes**. *Antimicrob*. *Agents. Chemother*. 45 (2): 480-4.

*Patel G, Huprikar S, Factor SH, Jenkins SG, Calfee DP. (2008) ; Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. ***Infect Control Hosp Epidemiol.;****29:1099-106.*

*Paterson, D. (2000).Recommendation for treatment of serve infection caused by Enterobacteriaceae producing extended spectrum beta Lactamase (ESβLs***).Clin.Microbiol. Infect***., 6(9):460-3.

*Paterson DL, Bonomo RA.(2005). Extended-spectrum, beta-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev. 18: 657-686.2005

*Perez. F.J.: and Hanson, N.D.(2002) Detection of plasmid mediated AmpC β – Lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. ***J. Clin Microbiol.*** 40(6): 2153-2162.

*Philippon, A.; Arlet, G.; and Jacoby, G.A.(2002) Plasmid determined AmpC —type β — Lactamases. Antimicrob**. *Agents Chemother*.vol 46(1):I—11.

*Pillai, D. R., McGeer, A. and Low, D. E. (2011) ; New delhi metallo-lactamase-1 in enterobacteriaceae:emerging resistance**. *CMA.J.,*** 183(1)

*Pinsky,B.A., Baron,E.J., Janda,J.M. and Banaei,N.(2009). Bartholdi's abscess caused by hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* **. *J* . *Medical Microbiology*** .58 :671-673.

*Podschun. R.; and Ullmann. V.(1998). *Klebsiella* spp. As Nosocomial pathogens: Epidemiology, Taxanomy, Typing method, and Pathogenicity,

factors. ***Clin. Micrbiol. Rev***. 11(4): 589 — 603.

*Poirel, L.; Thomas, I.; Naas, T.; Karim, A.; and Nordmann, P.(2000) Biochemical sequence analysis of GES-1 a novel class A, extended – spectrum 13 – Lactamase, and the class 1 integron in 52 from Klebsiella pneumoniac. ***Antimicrob. Agents Chemother***. 44(3): 622-632

*Poirel L, Pitout JD, Nordmann P. Carbapenamases: molecular diversity and clinical consequences. ***Future Microbiol***. 2007;2:501-12. This article on PubMed

*Prescott, L. M.; Harley, J. P. and Klein, D. A. (2005). Microbiology. 6th ed. McGraw. Hill companies Inc. New York.

*Prospero, E. , Barbadoro, P. , Esposto, E. , Manso, E. , Martini, E. , Savini, S. , Scaccia, F. , Tantucci, L. , Pelaia, P. , D'Errico, M. M. (2010) ; Extended-spectrum ß-lactamases Klebsiella pneumoniae: multimodal infection control program in Intensive Care Units. ***J prev med hyg***; 51: 110-115

Q

*Qader, A. R. and Muhamad, J. A. (2010) ; Nosocomial infection in Suliamani Burn Hospital , ***Iraq.Annuls of Burns and fire Diasters***-vol.XXIII-n.4.p.177-181

R

*Ranjbanshi,A.(2008):Study on Heavy Metal Resistant Bacteria in Guheswori Seage Treatment Plant.Our Nature, 6:52-57.

*Rajehwari ,H. ; Nagaveni ,S .; Oli , A. and Chandrakanth ,K.(2010). Multiple Antibiotic Resistance and Esbl Producing *Klebsiella pneumonia* isolated from clinical Urine Samples . 5(1): 89-91.

*Rice, L. B. , Carias, L. L. , Hujer, A. M. , Bonafede, M. , Hutton, R. , Hoyen, C. and Bonomo, R. A. (2000) ; High level expression of chromosomally encoded SHV-1β- lactamases and an outer membrane protine change confer resistance to ceftazidime and pipracilline tazobactam in clinical isolation of *Klebseilla pneumoniae* . Anfimmicrob. ***Agents and chemothe***. 44(2):362-367.

*Riley, M.A. (1998). Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. ***Annu***. ***Rev.Genet***. ,32 : 255–278.

*Riley,M. &Chavan,M.(2007). Bacteriocins ecology and evolution .Springer-Verlag ,London ,United kingdom .

*Riley, M.; Pinou,T.; Wertz,J.; Tan,Y.& Valletta, C. (2001) .Molecular Characterization of the klebicin B plasmid of *Klebsiella pneumoniae*. Plasmid .,45:209-221

*Riley ,M .A .; Goldstone , C .M ; Wertz ,.J .E and Gordon .D.(2003). A phylogenetic approach to assessing the targets of microbial warfare. *J. EVOL.BIOL*.16:690-697.

*Revdiwala, S. , Rajdev, B. M. and Mulla, S. (2012) ; Characterization of Bacterial Etiologic Agents of Biofilm Formation in Medical Devices in Critical Care Setup. Hindawi Publishing Corporation Critical Care Research and Practice .p.1-8.

*Rouch, D.A.; Lee,B.T.O. ; and Morby, A.P. (1995) Understanding cellular responses to toxic agents: a model for mechanism choice in bacterial metal resistance***. *J. Ind. Microbiol***. 14: 132 – 141.

*Ryan, K. J. and Ray, C. G. (2004). Sherris Medical Microbiology. 4th ed. McGraw Hill, ISBN 0.8385-85: 9-9.

*Ruiz, J. (2003). Mechanisins of resistance to quinolones target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. ***J.of Antimicrobial Chemotherapy***; 51 : 1109-1117.

S

*Sahly , H. ; Navon -venezia , S. ; Roesler ,L. ; Hay , A. ;Carmell , Y. ; Podschun , R. ; Hennequin , C. ; Forestier , C. and Ofek , I. (2008). Extended spectrum B -Lactamase production is associated with an increase in cell Invasion and expression of fimbrial adhesion in *Klebsiella pneumoniae*. ***Antimicrobial agent and Chemotherapy,*** 52(9):3029-3034.

*Sakoog, D.; WEST, D. and Holler, F. (1988) Fundamental of Analytical Chemistry. 5th ed. Saunders College Publishing, New York.

*Sarika,A.R.; Lipton ,A .P .and Aishwarya ,M .S.(2010). Bacteriocin Production by a New Isolate of *Lactobacillus rhamnosus* GP1 under Different Culture Conditions ***.J. Food Science and Technology*** .2(5):291-297.

*Sarojamma, V. and Ramakrishna, V. (2011) ; Prevalence of ESBL-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Tertiary Care Hospital. International Scholarly Research Network . ***ISRN Microbiology***.p.1-5

*Schroll, C. , Barken, K. B. , Krogfelt, K. A. and Struve, C. (2010) ; Role o f type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. ***BMC Microbiology*** p.2-10

*Seldeen,K.(1999): Transfer of genetic material between different general of bacteria.

* Shakib, P. , Ghafourian, S. , Zolfaghary, M. R. , Hushmandfar, R. , Ranjbar, R. and Sadeghifard, N. (2012) ; Prevalence of OmpK35 and OmpK36 porin expression in beta-lactamase and non-betalactamase-producing *Klebsiella pneumonia*. Biologics: ***Targets and Therapy***:p. 1–4

*Shamim, S. and Rehman, A. (2012) ; Cadmium resistance and accumulation potential of *Klebseilla pneumoniae* strain CBL-1 isolated from industrial west water **. *Pakistan J.200l.,*** vol.44(1), pp. 203-208

*Shanks, R. M. Q. , Stella, N. A. , Lahr, R. M. , Wang, S. , Tara I. Veverka, T. I. , Kowalski, R. P. and Liu, X. (2012) ; Serratamolide is a Hemolytic Factor Produced by Serratia Marcescens. PLoS ONE 7(5): /***journal.pone***.p.1-5

* Sharmeen, R. , Hossain, N. , Rahman, M. , Foysa, J. and Miah, F. (2012) ; *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

*Shen, D.; Winokur,P.; and Jones, R.N.(2001) Characterization of extended – spectrum beta- Lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* from Beijing***. China. Int. J. Antimicrob. Agents Chemother***. 18(2): 185 – 188

*Silver, S.; and Misra, T.K.(1984) Bacterial transformations of and resistances to heavy metals. In: Genetic control of environmental pollutants.: 23 – 46. Edited by Omenn, S.G.; and Hollaender, A. Plenum press, London.

*Sikarwar, A.S. and Batra, H.V. (2011); Challenge to healthcare: Multidrug resistance in Klebsiella pneumoniae . ***International Conference on Food Enginering and Biotechnology***.p.2-8

*Stahlhut , S .G.; Chattopadhyay ,S .; struve ,C.; Weissman , S.J .; Aprikian , P.;Libby , S. J .; Fange , F . C .; Krogfelt , K . A. and Sokurenko , E .V .(2009). Population Variability of the FimH Type 1 Fimbrial Adhesin in *Klebsiella pneumoniae* **. *J . Bacteriology*** .Vol .191(6) : pp. 1941-1950.

*Stahlhut, S. G. , Struve, C. , Krogfelt, K. A. and Reisner, A. (2012) ; Biofilm formation of Klebsiella pneumoniae on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. ***FEMS Immunol Med Microbiol*** 65 . 350–359

*Stocks, E.J.; and Ridway, G.L.(1987) Handling clinical specimens for microbiological studies 5th ed. Churchil living stone. (Cited). P: 173–201

*Struve,C.;Bojer,M.;Nielsen,E.M.;Hansen,D.S. & Krogfelt,K.A. (2005).Investigation of putative virulence gene *magA* in worldwide collection of 495 *Klebsiella* spp. Isolates : *magA* is restricted to the gene cluster of *Klebsiella pneumoniae* capsule serotype k1.***J.med.microbiology***.,54(11):1111-1113.

*Suk Han,J. , Jang, I-Y. , Ryu,H-S. and Kim,W-Y.(2010): Hemolysin Gene Expression in the hns Knockout Mutant of Klebsiella pneumoniae UN Strain **. *J. Korean Soc*. *Appl. Biol. Chem***. 53(4), 401-406

T

*Talaro,T.(2002).Foundations in Microbiology .4th .Ed. The McGraw-Hill Companies ,USA.

*Tanaka, T.; Kawase, M.; Tani, S.(2003). Urease inhibitory activity of simple α, β-unsaturated ketones. ***Life Sciences***. 73: 2985-90.

*Todar, K.(2007).The mechanism of bacterial Pathogenicity ‘‘*Klebsiella*’’. Todar’s Textbook of bacteriology.Wisconin-Madison Inc.USA.

*Talaro,T.(2008).Foundations in Microbiology‘‘ Pathogenic Gram Negative Cocci and Bacilli’’5th.Ed.The McGraw-Hill Companies ,USA.

*Tortora ,G. ;Funke ,B. and Case,C.(2004). Microbiology.8th .Ed . Pearson Benjamin Cumming.USA.

*Tortora, G.J. Funke, D.R. and Case, C.L.(2007). Microbiology . 3rd ed . pearson Education Inc. USA.

*Tu Quoc, P.H.; P. Genevaux; M. Pajunen; H. Savilahti; C. Georgopoulos; J. Schrenzel; and W.L. Kelley. 2007. Isolation and Characterization of Biofilm Formation-Defective Mutants of *Staphylococcus aureus*. Infect. ***Immun.*** 75(3):1079-1088.

*Turnidge, J.; Bell, J. and Biedenbach, D.J. (2002). Pathogen occurrence and antimicrobial resistance trends among urinary tract infection isolates in the Asia-Western. ***Int-J-Antimicrob-Agents***; vol.20(1) : 7-10.

U

*Ueda, Y. & Sunagawa, M.(2003). In vitro and in vivo activity of novel 2-(thiazol-2-ylthio)-1-beta-methylcarbapenemeswith potent activity against multiresistant gram-positive bacteria. ***Antimicrob. Agents Chemother***. Aug.47 (8): 2471-8.

*Umeh,O.;Berkowitz,L.;Shepp,D.;Talavera,F.;King,J.;Mylonakia,E. & Cunha , B. (2006). Infectious disease, *Klebsiella* Infection ***.J .eMdicine***.,27: (1).

V

*Vandepitte, J.; Engback, K.; Piot, P. and Heuck, G. (1991). Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. WHO Switzerland.

*Vincent ,W.(2004). Infections caused by member of the Genus *Klebsiella* . ***Infectious disease Update***.11(5):28-33.

*Villar, J.; Lydon, R.; Gulmezoglu.(2000) Duration of treatment for asymptomatic bacteriuria during pregnancy, Cochrane — database. England. (Midline).

*Virella, G. (1997) ; Microbiology and Infectious diseases. Middel East Edition(3rd ed.). MASS Publishing Co. ,Williams & Wilkins Review.part 1.

*Volk, W.A.; Benjamin, D.C.; Kadner, R.J.; and Parsons, J. T.(1986) Essentials of medical Microbiology. 3th ed. Lippincott company, Philadelphia.

W

*Wang J-F, Chou K-C (2011) ; Insights from Modeling the 3D Structure of New Delhi Metallo-b-Lactamse and Its Binding Interactions with Antibiotic Drugs. PLoS ONE ***/journal.pone***.p.1-7

* Wang, X. D. , Cai, J. C. , Zhou, H. W. , Zhang, R. and Gong-Xiang Chen, G. (2009) ; Reduced susceptibility to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates associated with plasmid-mediated b-lactamase production and OmpK36 porin deficiency. ***J.of Medical Microbiology*** , 58, 1196–1202.

* Wayne (PA) (2010) ; Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twentieth informational supplement update M100-S20-U.

*Weizmann, T. M.; Adamou, J. E. and Langermann, S. (1999). Adhesion as target for vaccine development***.** ***Emerging infectious diseases***,p. 396 - 403.

*Wendt, C., Schütt, S., Dalpke, A. H. , M. Konrad, M. , Mieth, M. , Trierweiler-Hauke, B. , M. A. Weigand, M. A. , Zimmermann, S. , K. Biehler, K. and Jonas, D.(2010) ; First outbreak of Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* in Germany. ***Eur J clin microbiol infect dis***., 29:563–570.

*White,C.; and Gadd,G.M.(1998) Accumulation and effects of cadmium on sulfate- reducing bacterial biofilms**.** ***Microbiology***. 144:407 – 415.

*WHO (1978) Techniques for the detection of β – Lactamase producing strains *ofneisseria gonorrhoeae*. 616: 137 – 143.

*Wu, M-F. , Yang, C-Y. , Lin, T-L. , Wang, J-T. , Yang, F-L. , Wu, S-H. , Hu, B-S. , Chou, T-Y. , Tsai, M-D. , Chi-Hung Lin, C-H. , and Hsieh, S-L. (2009) ; Humoral Immunity against Capsule Polysaccharide Protects the Host from *magA_ Klebsiella pneumoniae*-Induced Lethal Disease by Evading Toll-Like Receptor 4 Signaling.***Infection and immunity***, Vol. 77, No. 2 p. 615–621

*Wei, Z-Q. , Chen, Y-G. , Yu, Y-S. , Lu, W-X. and Li, L-J. (2005) ; Nosocomial spread of multi-resistant *Klebsiella pneumoniae* containing a

plasmid encoding multiple β-lactamases . doi: 10.1099/jmm.0.46151-0 ***J Med Microbiol*** *vol. 54 no. 9 885-888*

Y

* Yedekci, S. , Erac, B. and Limoncu, M. H. (2012) ; Detection of the efflux pump-mediated quinolone resistance in esbl positive *escherichia coli* and *klebsiella pneumoniae* isolates by phe-arg-βeta-naphthylamide. ***Turk J. Pharm. Sci***. *67-74*

*Yeh,K.M.;Karup,A.;Siu,L.K.;Koh,y.l.;Fung,C.P.;Lin,J.C.;Chang,F.Y. &Kok,T.H.(2007). Capsular serotype K1or K2 rather than *magA* and rmpA ,is a major virulence determinant for *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in Singapore and Taiwan ***.J.Clin.Microbiol***., 466-471.

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.

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education & Scientific Research
Diyala University
College of Education for Pure Science
Department of Biology

Bacteriological and Genetic Study of *Klebsiella spp* Isolated from different Infections , 2012

A thesis

Submitted to the Council of college of Education for Pure Science/Diyala University In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Biology/Microbiology

By
Eman Abass Ali AL-Zengena
B.Sc.Biology

Supervised by
Dr.Abbas Aboud Farhan Al- Dolaymi — **Professor**
Dr. Hadi Rahman Rasheed Al- Taai — **Assistant Professor**

2013 **1434**