



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

دراسة بكتريولوجية وجزئية لمرض الالتهاب المعوي القولوني الناخر عند الأطفال الرضع

رسالة مقدمة

إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة- ابن الهيثم / جامعة بغداد وهي
جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير علوم في علوم الحياة / الأحياء
المجهرية

من قبل

عبد الكريم عناد حمود

بكالوريوس علوم في علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة- ابن الهيثم / جامعة بغداد

٢٠٠٠-٢٠٠١

بإشراف

أ.م.د. لمى عبد الهادي زوين

٢٠١٩م

١٤٤٠هـ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

يَرْفَعِ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنكُمْ
وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ وَاللَّهُ بِمَا
تَعْمَلُونَ خَبِيرٌ (١١)

صدق الله العظيم

سورة المجادلة

الآية ١١

إقرار المشرف على الرسالة

اشهد أن اعداد هذه الرسالة قد جرى تحت اشرافي في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة-ابن الهيثم/ جامعة بغداد، وهي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير علوم في علوم الحياة / احياء مجهرية.

التوقيع: 

المشرف: أ.م.د. لمى عبد الهادي زوين

المرتبة العلمية: استاذ مساعد

العنوان: قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة - ابن الهيثم / جامعة بغداد

التاريخ: 2019 / 6 / 30

توصية رئيس قسم علوم الحياة

اشارة إلى التوصية أعلاه أرشح هذه الرسالة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيان

الرأي فيها.

التوقيع: 

الاسم: أ.م.د. ثامر عبد الشهيد محسن

المرتبة العلمية: استاذ مساعد


العنوان: قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة - ابن الهيثم / جامعة بغداد

التاريخ: 2019 / 6 / 30

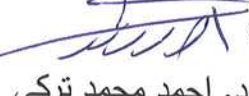
إقرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة الموقعين أدناه، نشهد أننا اطلعنا على الرسالة الموسومة: دراسة بكتريولوجية وجزئية لمرض الالتهاب المعوي القولوني الناخر عند الاطفال الرضع. من قبل الطالب (عبدالكريم عناد حمود الفهداوي) وهي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير علوم في علوم الحياة / الأحياء المجهرية. وقد ناقشنا الطالب في محتوياتها وفيما له علاقة بها وذلك بتاريخ / / 2019 ووجدناها مستوفية لمتطلبات الماجستير علوم في علوم الحياة وعليه نوصي بقبول الرسالة.

عضو اللجنة

التوقيع: 
الاسم: د. عصام جاسم خليفوي
المرتبة العلمية: استاذ مساعد
التاريخ: 2019 / 6 / 30

عضو اللجنة


التوقيع: 
الاسم: د. احمد محمد تركي
المرتبة العلمية: استاذ
التاريخ: 2019 / 6 / 30

PDF Reducer Demo

رئيس اللجنة

التوقيع: 
الاسم: احسان عرفان حسين
المرتبة العلمية: استاذ
التاريخ: 2019 / 6 / 30

عضو اللجنة (المشرف)

التوقيع: 
الاسم: د. لمي عبدالهادي زوين
المرتبة العلمية: استاذ مساعد
التاريخ: 2019 / 6 / 30

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة - ابن الهيثم/ جامعة بغداد

التوقيع: 

الاسم: د. حسن احمد حسن

المرتبة العلمية: استاذ

العنوان: كلية التربية للعلوم الصرفة-ابن الهيثم / جامعة بغداد

التاريخ: 2019 / 7 / 21

الإهداء

إلى الخيمة التي استظل بها... شعلتني التي أنارت الظلمات
... أبي وأمي أسكنهما الله الجنة .

إلى سندي زوجتي وقلدة كبدي أطفالي حارث ومريم .
إلى من ضحى بدمائه الزكية من أجل الوطن ... أخي الشهيد
محمود أسكنه الله الجنة .

إلى كل من وقف معي سواء كانت وقفة مادية أم معنوية .
إلى كل الخيرين في العالم حيثما كانوا ...

أهدي لهم ثمرة جهدي المتواضعة .

عبد الكريم عناد

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على أشرف المرسلين وخاتم النبيين والرحمة المهداة سيدنا محمد صلى الله عليه وعلى آله وصحبه وسلم أجمعين.

بعد أن أنهيت بحثي، لا يسعني إلا أن أتقدم بوافر التقدير والاحترام والعرفان والوفاء والاخلاص إلى الأستاذ المساعد الدكتورة لمى عبد الهادي زوين لاشرفها على رسالتي بكل خطواتها وما بذلته من جهود علمية رصينة رغم الظروف القاهرة، كذلك أتقدم بالشكر الجزيل إلى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة - ابن الهيثم / جامعة بغداد وإلى رئيس قسم علوم الحياة الدكتور ثامر عبد الشهيد وإلى جميع أساتذتي الأفاضل لما قدموه من جهود ثمرة ومعلومات علمية ونصائح وارشادات.

وأتقدم بخالص شكري إلى منتسبي مستشفى حماية الأطفال في مدينة الطب ببغداد.

كما الشكر موصولاً الى منتسبي مختبر الصحة المركزي ببغداد لما ابده من مساعدة لانجاز بحثي.

وأتقدم بشكري إلى يد العون الأستاذ الدكتور أحمد عبد العزيز رشيد الفهداوي اختصاص قلبية باطنية في مستشفى أبو ظبي بالإمارات كما أثني على صاحب المواقف المشرفة الدكتور محمد شاكر صالح الفهداوي، مدير قسم الصيدلة في دائرة صحة الانبار.

كما أقف اجلالاً واكباراً وتقديراً واحتراماً إلى من آزرني في بحثي صديقي المدرس المساعد مصطفى سهيل الجبوري ماجستير أحياء مجهرية / كلية التربية للعلوم الصرفة - ابن الهيثم / جامعة بغداد.

شكري وتقديري إلى الكيميائي رياض طالب مخلف الفهداوي / شعبة المختبرات / دائرة صحة الانبار لما أبداه من مساعدات قل نظيرها.

كما يسعدني أن أتقدم بالشكر والتقدير إلى جميع أصدقائي وزملائي من طلبة الدراسات العليا لمساندتهم لي طيلة مدة الدراسة.

الباحث

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة لعزل وتشخيص الأجناس البكتيرية المسببة للالتهاب المعوي القولوني الناخر عند الأطفال الرضع، إذ جمعت 64 عينة سريرية من مستشفى حماية الأطفال بمدينة الطب ببغداد لأطفال مصابين بالالتهاب المعوي القولوني الناخر تضمنت 41 عينة من الخروج Stool و(14) عينة من الدم Blood و(9) عينات من البول Urine للمدة من 2018/1/29 إلى 2018/4/4. زرعت جميع العينات على وسط أكار الماكونكي MacConkey agar ووسط أكار الدم Blood agar لغرض تشخيصها.

شخصت العزلات بالفحوصات المجهرية، المزرعية والكيموجيوية، فضلاً عن التشخيص باستعمال جهاز Vitek-2 ، إذ أمكن الحصول على 43 عزلة، وأظهرت نتائج التشخيص بجهاز الفايتهك إن 26 عزلة (60.47%) تعود لبكتريا *Klebsiella pneumoniae* و 8 عزلات (*Escherichia coli* 18.60%) و 4 عزلات (*Pseudomonas aeruginosa* 9.30%) وعزلتين *Klebsiella oxytoca* (4.65%) وعزلتين *Enterobacter cloacae* بنسبة (4.65%) وعزلة واحدة لبكتريا *Proteus hauseri* بنسبة (2.33%).

إذ كانت بكتريا *K. pneumoniae* هي النوع السائد في العينات المأخوذة من الأطفال الرضع المصابين بالالتهاب المعوي القولوني الناخر، وتوزعت بواقع 23 عزلة (88.46%) بكتيرية المعزولة في عينات الخروج وعزلتين (7.69%) من عينات الدم وعزلة واحدة (3.84%) من البول.

بينت نتائج فحص الحساسية باستعمال جهاز Vitek-2 كونه أكثر كفاءة مقارنة بالطريقة التقليدية اتجاه 18 مضاداً حيوياً لتحديد التركيز المثبط الأدنى Minimum Inhibitory Concentration (MICs)، وبينت النتائج أن جميع العزلات البكتيرية كانت مقاومة وبنسبة 100% لمضادَي Amoxicillin و Ampicillin، فيما أظهرت العزلات البكتيرية مقاومة بنسبة

96.15% لمضاد Piperacillin، ومقاومتها اتجاه المضادات الحيوية Cefazolin ،
 Trimethoprim/ Sulfamethoxazole و Cefepime ، Ceftriaxone ، Ceftazidime
 بنسبة 88.46% ومقاومة للمضاد Ampicillin/sulbactam بنسبة 73% والمضاد Cefoxitin
 بنسبة 61.54% ومقاومة للمضاد Meropenem والمضاد Tobramycin بنسبة 57.70%،
 وكذلك مقاومة للمضاد Amikacin والمضاد Gentamicin بنسبة 50%، ومقاومة للمضاد
 Levofloxacin والمضاد Ciprofloxacin بنسبة 38.46%، ومقاومة للمضاد
 بنسبة 23.07% ومقاومة للمضاد Nitrofurantoin بنسبة 15.38%، بينما كانت العزلات
 البكتيرية متوسطة المقاومة للمضاد Ampicillin/Sulbactam والمضاد Levofloxacin بنسبة
 19.23%، وللمضاد Meropenem بنسبة 3.84% وللمضاد Ciprofloxacin بنسبة 7.69%
 وللمضاد Nitrofurantoin بنسبة 53.84%.

بينت نتائج التحري عن بعض عوامل الضراوة مظهرياً بأن جميع عزلات بكتريا
K.pneumoniae كانت قادرة على الالتصاق بوساطة الخمل من النوع الأول T1f بنسبة
 61.54% والخمل من النوع الثالث T3f بنسبة 38.46%، واختبرت قدرة البكتريا على تكوين
 الغشاء الحيوي Biofilm باستعمال طريقة الكونغو الأحمر، إذ بينت النتائج قدرة أغلب العزلات
 البكتيرية على تكوين الغشاء الحيوي، كان منها 14 عزلة بنسبة 53.84% مكونة للغشاء الحيوي
 وبشكل قوي و 10 عزلات وبنسبة 38.46% مكونة للغشاء الحيوي بشكل متوسط، في حين كانت
 عزلتان وبنسبة 7.7% غير مكونة للغشاء الحيوي.

وعند الكشف عن وجود بعض جينات الضراوة لبكتريا *K.pneumoniae* أظهرت النتائج
 وجود كل من الجينات *fim A* و *fim H* التي تشفر عن بروتين *fim* وجينات *mrk A* و *mrk D*
 التي تشفر عن بروتين *mrk*، وأظهرت النتائج وجود الجينات *fim A*، *fim H* و *mrk A* بنسبة
 100% في جميع العزلات، أما في حين لم يحتوي أي عزلة من العزلات المدروسة على جين
mrk D.

المحتويات

الصفحة	الموضوع	الفقرة
i	الخلاصة باللغة العربية	
iii	المحتويات	
viii	قائمة الجداول	
ix	قائمة الأشكال	
x	قائمة الملاحق	
xi	قائمة المختصرات	
الفصل الأول		
1	المقدمة Introduction	1
الفصل الثاني		
3	استعراض المراجع Literature review	2
3	الوصف النسيجي للأمعاء	1-2
3	الأمعاء الدقيقة Small intestine	1-1-2
6	الأمعاء الغليظة Large intestine	2-1-2
6	مرض الالتهاب المعوي القولوني الناخر Necrotizing Enterocolitis (NEC)	3-1-2
8	الانواع البكتيرية المسببة للالتهاب المعوي القولوني الناخر	2-2
8	الانواع البكتيرية السائدة	1-2-2
8	بكتريا <i>Klebsiella pneumoniae</i>	1-1-2-2
9	وبائية بكتريا <i>K.pneumoniae</i>	1-1-1-2-2
10	الأمراضية Pathogenesis	2-1-1-2-2
10	عوامل الضراوة Virulence factors	3-1-1-2-2
11	الخمل Fimbriae	1-3-1-1-2-2
11	الخمل من النوع الأول Type 1 fimbriae (T1f)	1-1-3-1-1-2-2
12	الخمل من النوع الثالث Type 3 fimbriae (T3f)	2-1-3-1-1-2-2
13	خمل Kpc fimbriae	3-1-3-1-1-2-2
13	اللاصق KPF – 28 Adhesin	4-1-3-1-1-2-2
14	المحفظة Capsule polysaccharide (Cps)	2-3-1-1-2-2
14	عديد السكريد الدهني Lipopolysaccharide	3-3-1-1-2-2

15	Outer membrane proteins بروتينات الغشاء الخارجي (OmpA)	4-3-1-1-2-2
16	مقاومة بكتريا <i>K.pneumoniae</i> للمضادات الحيوية	4-1-1-2-2
17	Adhesion الالتصاق	5-1-1-2-2
17	Biofilm الغشاء الحيوي	6-1-1-2-2
18	الأنواع البكتيرية الأخرى	2-2-2
18	بكتريا <i>Proteus hauseri</i>	1-2-2-2
19	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2-2-2-2
20	<i>Escherichia coli</i>	3-2-2-2
20	<i>Enterobacter cloacae</i>	4-2-2-2
21	بكتريا <i>Klebsiella oxytoca</i>	5-2-2-2
الفصل الثالث		
23	Materials and methods المواد وطرائق العمل	3
23	Materials المواد	1-3
23	الأجهزة والأدوات المختبرية Laboratory equipment and instruments	1-1-3
24	Chemical materials المواد الكيميائية	2-1-3
25	الأوساط الزرع المستعملة في الدراسة	3-1-3
26	الصبغات والكواشف والمحاليل المستعملة في الدراسة	4-1-3
27	Kits العدد الجاهزة	5-1-3
28	المضادات الحيوية	6-1-3
29	primers البوادئ	7-1-3
30	Methods طرائق العمل	2-3
30	Sterilization التعقيم	1-2-3
30	Solutions preparation تحضير المحاليل	2-2-3
30	Phosphate buffer saline محلول دارئ الفوسفات الملحي	1-2-2-3
30	Alsever's solution محلول السفير	2-2-2-3
31	Mannose solution محلول سكر المانوز	3-2-2-3
31	Congo red stain محلول صبغة الكونغو الحمراء	4-2-2-3
31	Tris Borate EDTA buffer محلول دارئ الترحيل	5-2-2-3
31	Primers preparation تحضير البوادئ	6-2-2-3
32	Reagents preparation تحضير الكواشف	3-2-3

32	Oxidase reagent كاشف الأوكسيديز	1-3-2-3
32	Catalase reagent كاشف الكتاليز	2-3-2-3
32	Preparation of culture media تحضير الأوساط الزرعية	4-2-3
32	Ready – Made culture media الأوساط الزرعية الجاهزة preparation	1-4-2-3
33	Laboratory culture media الأوساط الزرعية التركيبية	2-4-2-3
33	Blood agar base وسط أكار الدم	1-2-4-2-3
33	Urea agar وسط أكار اليوريا	2-2-4-2-3
33	Congo red agar media وسط أكار الكونغو الأحمر	3-2-4-2-3
33	Samples collection جمع العينات	5-2-3
34	Samples culture زرع العينات	6-2-3
34	Bacterial isolates diagnosis تشخيص العزلات البكتيرية	7-2-3
34	Morphological diagnosis التشخيص المظهري	1-7-2-3
34	Microscopic diagnosis التشخيص المجهرى	2-7-2-3
34	Biochemical tests الاختبارات الكيموحيوية	3-7-2-3
34	Oxidase test اختبار الأوكسيديز	1-3-7-2-3
35	Catalase test اختبار الكتاليز	2-3-7-2-3
35	Indol test اختبار الأندول	3-3-7-2-3
35	Methyl red test اختبار احمر المثيل	4-3-7-2-3
35	Voges – proskauer test اختبار فوكس – بروسكاور	5-3-7-2-3
36	Citrate utilization اختبار استهلاك السترات	6-3-7-2-3
36	Kligler iron agar اختبار السكريات على وسط	7-3-7-2-3
36	Urease test اختبار اليوريز	8-3-7-2-3
37	Vitek -2 compact system التشخيص بجهاز الفايترك	8-2-3
38	Preservation of bacterial حفظ العزلات البكتيرية isolates	9-2-3
38	Short term storage الحفظ قصير الامد	1-9-2-3
38	Long term storage الحفظ طويل الامد	2-9-2-3
38	فحص اختبار الحساسية للمضادات الحيوية لبكتريا <i>K.pneumonia</i> باستعمال التركيز المثبط الأدنى Sensitivity test of <i>K.pneumoniae</i> MIC	10-2-3

39	الكشف عن تكون الغشاء الحيوي باستعمال وسط أكار الكونغو الأحمر	11-2-3
39	اختبار تلازن كريات الدم الحمر	12-2-3
39	تحضير العالق البكتيري	1-12-2-3
39	تحضير عالق كريات الدم الحمر للإنسان فصيلة A	2-12-2-3
40	التحري عن الخمل من النوع الأول والثالث بطريقة تلازن دم الإنسان	3-12-2-3
40	استخلاص دنا البكتريا الجينومي Genomic DNA extraction	13-2-3
42	الكشف الجزيئي عن جينات <i>mrk D</i> , <i>mrk A</i> , <i>fim H</i> , <i>fim A</i> باستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لبكتريا <i>K.pneumoniae</i>	14-2-3
43	الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز Agarose gel electrophoresis	15-2-3
الفصل الرابع		
45	النتائج والمناقشة Results and Discussion	4
45	جمع وزرع العينات Collection and culturing of samples	1-4
45	عزل وتشخيص العزلات البكتيرية Isolation and Identification of bacterial isolates	2-4
45	التشخيص المجهرى Microscopic identification	1-2-4
45	الاختبارات الكيموحيوية Biochemical tests	2-2-4
46	التشخيص بجهاز الفايترك Vitek-2 compact system GN-card	3-2-4
48	مقاومة بكتريا <i>K.pneumoniae</i> للمضادات الحيوية	3-4
56	الأنماط المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية لبكتريا <i>K.pneumoniae</i>	4-4
58	الكشف عن قابلية بكتريا <i>K.pneumoniae</i> على الالتصاق بوساطة T1f و T3f	5-4
60	قابلية عزلات بكتريا <i>K.pneumoniae</i> على تكوين الغشاء الحيوي	6-4
63	الكشف الجزيئي عن الجينات Molecular detection of genes	7-4

70	Conclusions الاستنتاجات
71	Recommendations التوصيات
72	References المصادر
A-D	الملاحق

قائمة الجداول

الصفحة	الجدول	الرقم
23	الاجهزة والأدوات المستعملة في الدراسة	1-3
24	المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة	2-3
25	الأوساط الزرعية المستعملة في الدراسة	3-3
26	الصبغات والكواشف والمحاليل المستعملة في الدراسة	4-3
27	العدد المستعملة في الدراسة	5-3
28	المضادات الحيوية المستعملة في الدراسة	6-3
29	البوادىء المستعملة في الدراسة	7-3
42	محتويات مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل	8-3
43	الظروف المثلى للكشف عن الجينات <i>fimH</i> , <i>mrkA</i> , <i>mrkD</i> و <i>fimA</i>	9-3
49	مقاومة بكتريا <i>K.pneumoniae</i> للمضادات الحيوية	1-4
57	أنماط المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية لعزلات بكتريا <i>K.pneumoniae</i>	2-4
58	مقاومة وحساسية بكتريا <i>K.pneumoniae</i> لسكر المانوز باستعمال فحص تالزن كريات الدم الحمر	3-4
60	قابلية بكتريا <i>K.pneumoniae</i> على تكوين الغشاء الحيوي بطريقة Congo red	4-4

قائمة الأشكال

الصفحة	الشكل	الرقم
48	النسب المئوية للعزلات البكتيرية المسببة للالتهاب المعوي القولوني الناخر عند الأطفال الرضع.	1-4
61	قابلية بكتريا <i>K.pneumoniae</i> في تكوين الغشاء الحيوي على وسط Congo red agar.	2-4
64	الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لعزلات بكتريا <i>K.pneumoniae</i> باستعمال بادىء Primer لجين <i>fim A</i> (500) زوج قاعدة باستعمال هلام الأكاروز بتركيز 1.5% و فرق جهد 100 فولت ولمدة 90 دقيقة.	3-4
66	الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لعزلات بكتريا <i>K.pneumoniae</i> باستعمال بادىء Primer لجين <i>fim H</i> (576) زوج قاعدة باستعمال هلام الأكاروز بتركيز 1.5% و فرق جهد 100 فولت ولمدة 90 دقيقة.	4-4
68	الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لعزلات بكتريا <i>K.pneumoniae</i> باستعمال بادىء Primer لجين <i>mrk A</i> (498) زوج قاعدة باستعمال هلام الأكاروز بتركيز 1.5% و فرق جهد 100 فولت ولمدة 90 دقيقة.	5-4

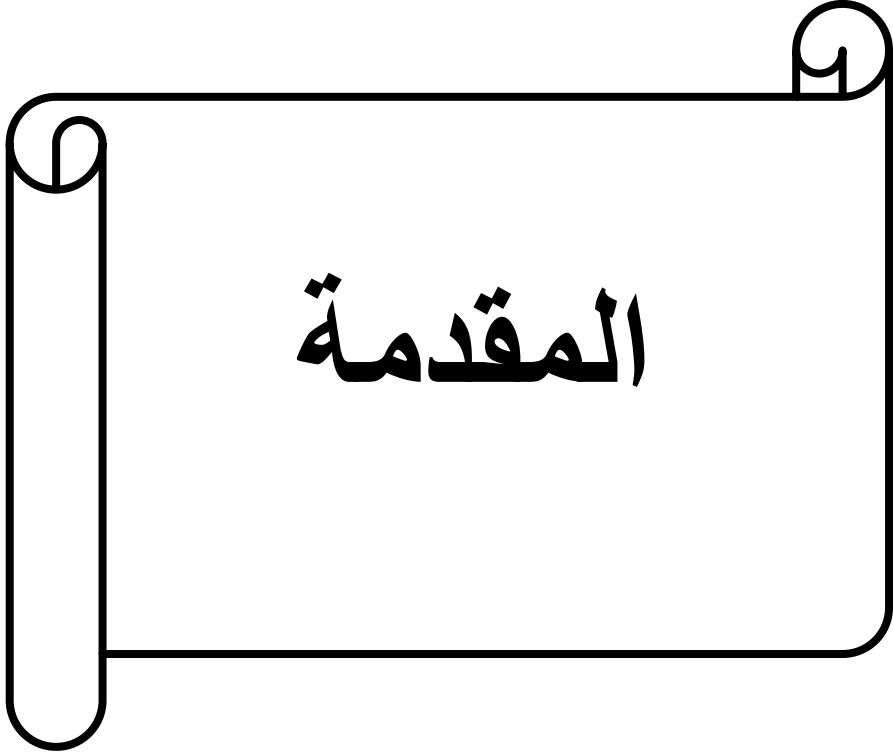
قائمة الملاحق

الصفحة	العنوان	الملحق
A	الاختبارات الكيموحيوية لتشخيص العزلات البكتيرية	1
C	بيانات من الاختبارات الكيموحيوية لتشخيص العزلات البكتيرية باستعمال جهاز الفايتهك Vitek -2 Compact System GN-Card.	2
D	مصدر العينات واعداد العزلات البكتيرية المعزولة من الاطفال المرضى بالالتهاب المعوي القولوني الناخر	3

قائمة المختصرات

Abbreviation	Key
NEC	Necrotizing Enterocolitis
VLBW	Very Low Birth Weight
M.Cells	Microfold Cells
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
T1f	Type 1 fimbriae
T3f	Type 3 fimbriae
UTI	Urinary Tract Infection
Cps	Capsule polysaccharide
CaUTI	Catheterized associated urinary tract infection
Lps	Lipopolysaccharide
MR/K	Mannose Resistant / <i>Klebsiella</i> Like fimbriae
Omp	Outer membrane protein
PBs	Phosphate Buffer Saline
EDTA	Ethylene – Diamine – Tetraacetic Acid
KIA	Kligler Iron Agar
MIC	Manimum Inhibitory concentration
GNID	Gram – Negative Identification
PCR	Polymerase Chain Reaction
bp	base pair
TBE	Tris – Borate – EDTA buffer
Tris	Trihydroxymethylglycine
UCA	Uroepithelial cell adhesion
PBD	Pyrrlobenzodiazepines
ESBL	Extended spectrum beta-lactamase
AMPC	Ampicillin c

الفصل الأول



المقدمة

1. المقدمة Introduction

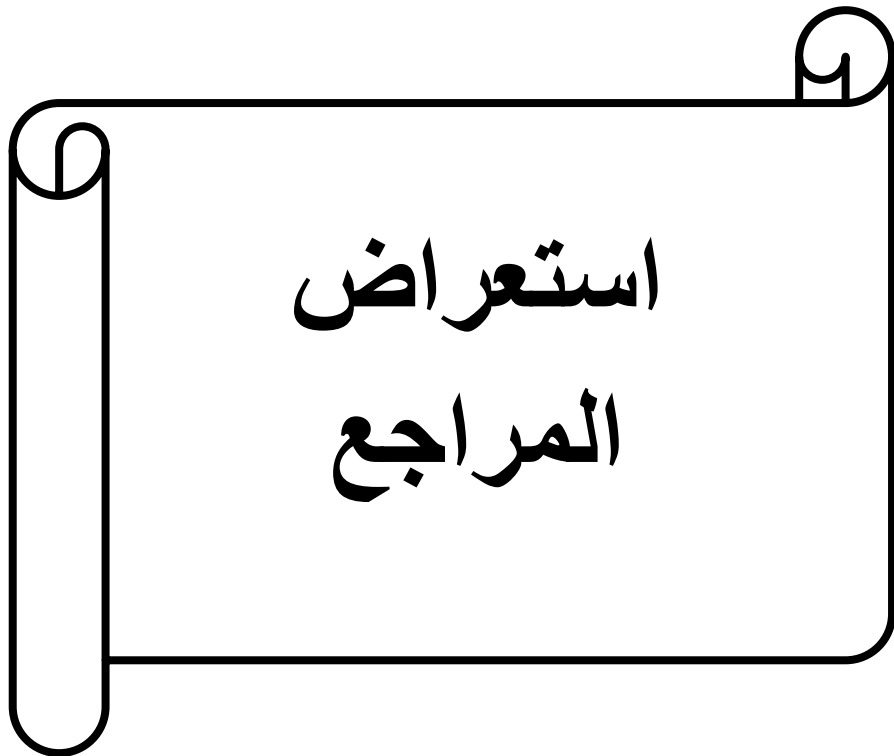
الالتهاب المعوي القولوني الناخر (Necrotizing Enterocolitis (NEC) مرض يصيب الجهاز الهضمي ويحدث أساساً في الأطفال الرضع المولودين قبل اكتمال مدة الحمل، والذين أوزانهم قليلة جداً (Very low birth weight (VLBW) أقل من 1.5 كغم بنسبة تتراوح من 5-10%. ان مسببات وامراضية هذا المرض لا تزال غير معروفة، والنتيجة الموجبة لزرع الدم تعد طريقة مركزية لكنها مضيعة للوقت وغالباً مرتبطة بنتائج سلبية خاطئة قد تؤدي الى الموت بعد ظهور الأعراض السريرية. يعد التشخيص المبكر لمرض الالتهاب المعوي القولوني الناخر صعباً (طبقاً لنتائج بيل) واجراء جراحة تؤدي الى ارتفاع الوفيات، لذلك فإنها مهمة لتحديد العلامات المفيدة لتشخيص هذا المرض، وتهيئة الوقت المناسب للعلاجات بدون الاستعمال المفرط للمضادات. تقلل الكلوبولينات المناعية في حليب الأم من التصاق البكتريا المرضية بالخلايا الطلائية المعوية ومن ثم تقلل الاستعمار بوساطة هذه البكتريا. يعتقد ان العوامل المضادة للعدوى وعوامل النمو في حليب الأم بانها تمثل دوراً مهماً، ومع ذلك فإن استعمال الكلوبولينات الفموية الخارجية لا تمتلك وضوحاً في التقليل من شدة المرض، وان نسبة الوفيات تصل الى 25% ، كما يمكن علاج استئصال الأمعاء بالحالات الشديدة (Balachandran et Warner et al ., 2016) (Nguyen et al ., 2017; al ., 2017; . تتضمن عوامل الخطورة للالتهاب المعوي القولوني الناخر عند الأطفال الرضع عدة اسباب منها عدم اكتمال مدة الحمل، استعمار مايكروبي، افتقار حليب الام. الأعراض السريرية لهذا المرض غير محددة ويمكن أن تتراوح من حالات بسيطة من عدم تحمل الطعام، سوء الهضم وتجمع الغاز في جدار الأمعاء مع انتفاخ البطن والخروج الدموي إلى حالات شديدة منها فشل الأعضاء وخمولها، انقطاع التنفس، الحموضة الأيضية، الصدمة الجرثومية، تجلط الدم، حدوث تنخر وثقب الأمعاء ومن ثم الموت، للبكتريا دور مهم في أحداث

المرض مثل البكتريا اللاهوائية والبكتريا السالبة لصبغة كرام وكذلك يحدث المرض بسبب ضعف المناعة والإصابات الفايروسية وعدم اكتمال نضج الأمعاء (Coggins *et al.*, 2015).

نتيجة كون الالتهاب المعوي القولوني الناخر عند الأطفال الرضع الخدج إحدى المشاكل الطبية التي تعاني منها معظم دول العالم وتزداد خطورة هذا المرض لعدم معرفة المسببات والأمراضية لهذا المرض وكذلك المؤشرات التشخيصية للمرض التي أغلبها تقتصر إلى الحساسية الكافية والدقة ولكن في الوقت الحاضر وبتقدم البحوث في هذا المرض أظهرت بأن أحد أسبابه هي الاصابات البكتيرية، لذا هدفت الدراسة الحالية للتحري عن الأجناس بكتيرية التي تسبب الالتهاب المعوي القولوني الناخر عند الأطفال، ولتحقيق هذه الأهداف تم اتباع الخطوات الآتية:

1. الحصول على عينات خروج، دم وبول من حالات مرضية لأطفال رضع أو حديثي الولادة.
2. عزل وتشخيص البكتريا بالطرائق المزرعية والكيموحيوية واستعمال جهاز الفايتهك و دراسة حساسيتها للمضادات الحيوية باستعمال التركيز المثبط الأدنى (MIC).
3. دراسة بعض عوامل الضراوة للبكتريا المعزولة لاسيما السائدة مثل الخمل من النوع الاول والثالث وتكوين الغشاء الحيوي.
4. عزل الـ DNA للكشف عن الجينات التي تشفر إلى عوامل الالتصاق T_1f و T_3f مثل *mrkD*, *mrkA*, *fimH*, *fimA*.

الفصل الثاني



2. استعراض المراجع Literature Review

1-2 الوصف النسيجي للأمعاء حسب ما جاء في (Eroschenko, 2013;

Abrahamsohn *et al.*, 2005)

1-1-2 الأمعاء الدقيقة Small intestine

تمثل الأمعاء الدقيقة موقعاً لهضم وامتصاص الغذاء بشكله النهائي وافراز الغدد الهضمية مثل الكبد Liver والصفراء Gallbladder والبنكرياس Pancreas ، إذ يكتمل الهضم فيها بامتصاص نواتج الهضم بواسطة الخلايا الظهارية Epithelial cells. تمتاز الأمعاء الدقيقة بطولها الذي يقدر بحوالي 5 أمتار وتتألف من ثلاثة أجزاء: الاثني عشري Duodenum، الصائم Jejunum واللفائفي Ileum وتتكون الامعاء الدقيقة من الآتي:

1. الغشاء المخاطي Mucous Membrane

تحتوي بطانة الأمعاء الدقيقة على عدد من الطيات الطولية Longitudinal folds الدائمة، الثنيات الدائرية (Kerckring's Valves) Plicae circulares التي تتألف من الغلالة المخاطية Tunica mucosa والغلالة تحت المخاطية Tunica submucosa وتمتلك أشكال هلالية او دائرية .

2. الزغابات المعوية Intestinal Villi

يتراوح طولها من 0.5-1.5 ملليمتر وتتكون الزغابات المعوية من طبقتي الغلالة وهي طبقة المخاطية الخلايا الظهارية Epithelium وطبقة الصفيحة المخصوصة Lamina propria ، إذ تكون بارزة في تجويف Lumen الأمعاء الدقيقة. تقع بين الزغابات Villi غدد نيببية بسيطة Simple tubular glands تدعى الغدد المعوية Intestinal glands وتستمر الخلايا الظهارية التي تغطي الزغابات مع الغدد المعوية. إن الغدد المعوية تتكون من الخلايا الجذعية Stem cells، بعض الخلايا الظهارية وهي خلايا الامتصاص، الخلايا الكأسية Goblet cells، خلايا

بانيث Paneth's cells، خلايا الطية المجهرية Microfold cells وخلايا الغدد الصم المعوية Enterendocrine cells.

3. الخلايا الظهارية Epithelial cells (الخلايا الامتصاصية Absorptive Cells)

وهي خلايا ظهارية عمودية بسيطة Simple columnar epithelial cells طويلة، تحتوي على نواة بيضوية تقع بالقرب من قاعدة الخلية وفي قمة الخلايا توجد الزغيبات Microvilli تدعى الحافة الفرشائية Brush border التي تعمل على زيادة مساحة التماس بين سطح الأمعاء والغذاء. إن وجود الثنيات Plicae، الزغابات Villi، والزغيبات Microvilli تزيد من مساحة الامتصاص Absorption، أما الخلايا الكأسية Goblet cells فهي تنتشر بين الخلايا الظهارية، إذ أنها أقل وفرة في الاثنى عشري وتزداد في اللفائفي. تقوم هذه الخلايا بإنتاج البروتينات السكرية المخاطية Mucopolysaccharides من نوع الميوسين Mucin، إذ أنها تكون المخاط الذي يعمل على حماية وتزيت بطانة الأمعاء.

تقع خلايا بانث Paneth's cells في الجزء القاعدي من الغدد المعوية وهي خلايا افرازية تحتوي على الحبيبات الافرازية في سايتوبلازمها في الجزء القمي من الخلية وتمتلك أنزيم Lysozyme الذي يقوم بهضم بعض البكتريا، إذ يعد ذا فعالية مضادة للبكتريا ويمثل دوراً مهماً في السيطرة على الفلورا الطبيعية في الأمعاء

أما خلايا الطية المجهرية (Microfold Cells (M. Cells) فهي خلايا ظهارية متخصصة تغطي العقد اللمفية للطخ باير Peyer's patches ويتم تمييزها بواسطة الغشاء القاعدي التي تكون الحفر الحاوية على عدد من الخلايا اللمفية ما بين الطلائية Intraepithelial lymphocytes والخلايا المقدمة للأنتيجين Antigen - Presenting cells (خلايا الماكروفيج).

4. خلايا الغدد الصم في الأمعاء Endocrine cells of the intestine

تحتوي الأمعاء على بعض الخلايا التي تنتشر بشكل واسع مع انتشار نظام الغدد الصم العصبي، هذه الخلايا تحرر افرازاتها الحبيبية بواسطة الإخراج الخلوي Exocytosis .

5. الصفيحة المخصوصة Lamina propria

تتألف طبقة الصفيحة المخصوصة بالأمعاء الدقيقة من نسيج ضام مفكك Loose connective tissue يحتوي على أوعية دموية ولمفاوية وأرومات ليفية Fibroblasts وإن طبقة الصفيحة المخصوصة تخترق لب الزغابات المعوية.

6. العضلية المخاطية Muscularis mucosa:

تتألف طبقة العضلية المخاطية من الألياف العضلية الملساء Smooth muscle fibers هي المسؤولة عن الحركات الإيقاعية للزغابات التي هي مهمة للامتصاص.

7. الغلالة تحت المخاطية Tunica submucosa:

تتألف الغلالة تحت المخاطية من نسيج ضام مفكك يحتوي على الأوعية الدموية والأعصاب وفي الاثني عشري يحتوي على غدد نيببية ملتوية Coiled tubular glands التي تفتح في البطانة المعوية وهذه الغدد تدعى غدد برونر Brunner's glands وتكون ذات إفراز مخاطي قاعدي تحت اس هيدروجيني pH 8.1-9.3 تعمل على حماية الغشاء المخاطي للاثني عشري من تأثيرات العصير المعدي الحامضي وجعل محتويات الأمعاء برقم هيدروجيني مثالي بفعل انزيمي بنكرياسي.

8. الغلالة العضلية Tunica Muscularis

تتألف من طبقتين من العضلات الملساء Smooth muscle fibers داخلية دائرية Internal circular layer والخارجية طولية الترتيب External longitudinal layer

وتحتوي على الأوعية الدموية Blood vessels التي تغذي الأمعاء ولها دور في عمليات الهضم والامتصاص بوجود الأعصاب Nerves .

9. الغلالة المصلية Tunica Serosa

وهي الطبقة التي تدخل ضمن طبقات الأمعاء الدقيقة التي تتألف من نسيج ضام مفكك يشكل طبقة نحيفة يحاط بصف من الخلايا الظهارية المتوسطة Mesothelium.

2-1-2 الأمعاء الغليظة Large intestine

تتألف الأمعاء الغليظة من الغللات الأربعة المخاطية، تحت المخاطية، العضلية و المصلية مع عدم وجود طيات أو ثنيات ما عدا وجودها في المستقيم، لا توجد زغابات، الغدد المعوية طويلة ويمكن تمييزها بوساطة الخلايا الكاسية والخلايا الظهارية (خلايا الامتصاص) الكثيرة العدد وعدد قليل من خلايا الغدد الصم المعوية، وتكون خلايا الامتصاص عمودية وتمتلك زغيبات غير منتظمة وقصيرة (Eroschenko, 2013; Abrahamsohn *et al.*, 2005).

3-1-2 مرض الالتهاب المعوي القولوني الناخر (NEC) Necrotizing Enterocolitis

يعد مرض الالتهاب المعوي القولوني الناخر السبب الأكثر شيوعاً في الاطفال الرضع الخدج، إذ يصيب ما يقارب 7 % من الاطفال ما دون وزن 1500 غم، Coggins *et al.*, (2015)، في حين اشار Fitzgibbons *et al.* (2009) الى ان مرض الالتهاب المعوي القولوني الناخر يصيب 3 % في الاطفال بوزن يتراوح بين 1251-1500 غم ويصل الى 12 % في الاطفال بوزن اقل من 750 غم، وتتضمن عوامل الخطورة في عدم اكتمال فترة الحمل، استعمار مايكروبي، إذ إن للبكتريا دوراً مهماً في احداث المرض مثل البكتريا اللاهوائية والبكتريا السالبة لصبغة كرام وكذلك يحدث بسبب ضعف المناعة والاصابات الفايروسية (Coggins *et al.*, 2015).

اشار (2012) *Smith et al.* بأن الاطفال الرضع الخدج المصابين بمرض الالتهاب المعوي القولوني الناخر الأكثر تطوراً كانوا مستعمرين بوساطة البكتريا الموجبة لصبغة كرام بينما هؤلاء الذين لم يتطور المرض لديهم كان استعمار بكتريا من النوع الموجبة والسالبة لصبغة كرام، وشكلت بكتريا *Staphylococcus spp.* اكثر الانواع السائدة، فضلاً عن افتقار حليب الأم يؤدي إلى التهاب الأمعاء التخري (Coggins *et al.*, 2015). بعض الدراسات بينت بأن الزيادة السريعة في التغذية تزيد خطورة المرض، مشيرة بأن التغذية المعوية تؤدي إلى ضمور معوي مع زيادة النفاذية والالتهاب وتعفن الدم المتأخر (Schanler *et al.*, 1999; Torrazza *et al.*, 2014; Bombell and McGuire, 2009).

إن الأعراض السريرية للالتهاب المعوي القولوني الناخر تكون غير محددة ويمكن ان تتراوح من حالات بسيطة بالأمعاء مثل عدم تحمل الطعام ، سوء الهضم، تجمع الغاز في جدار الأمعاء مع انتفاخ البطن مع الخروج الدموي إلى حالات شديدة مع فشل الأعضاء تمتاز بالخمول، انقطاع التنفس، الحموضة الايضية، الصدمة الجرثومية، تجلط الدم ، حدوث تنخر، ثقب الامعاء والموت (Coggins *et al.*, 2015).

تتضمن الأعراض ايضاً تضيق الأمعاء، متلازمة الأمعاء الدقيقة، تأخر في

النمو وتطور عصبي (Martin *et al.*, 2010; Hintz *et al.*, 2005)

2-2 الأنواع البكتيرية المسببة لالتهاب المعوي القولوني الناخر

1-2-2-1 الأنواع البكتيرية السائدة

1-1-2-2-1 بكتريا *Klebsiella pneumoniae*

ينتمي نوع *K.pneumoniae* إلى جنس *Klebsiella* الذي يعود إلى العائلة المعوية Enterobacteriaceae، وهي عصيات سالبة لصبغة كرام يتراوح طولها بين 0.6-6 مايكروميتر، بينما يتراوح عرضها 0.3-1 مايكروميتر، تظهر بشكل مفرد أو أزواج أو سلاسل قصيرة محاطة بمحفظة، لا هوائية اختيارية، غير متحركة، تمتلك آليتين في التمثيل الغذائي هما التنفس، والتخمير، درجة حرارة نموها 37م°، تخمر سكر الكلوكوز منتجة حامض وغاز كما أن أغلب سلالاتها تنتج *Butanediol* 2-3 كمنتج نهائي لتخمير الكلوكوز. تنمو بكتريا *K.pneumoniae* على أوساط زرعية مختلفة مثل أكار الماكونكي MacConkey، إذ تكون مستعمرات وردية اللون مخاطية وملساء كونها مخمرة لسكر اللاكتوز، وأيضاً مخمرة لسكر الكلوكوز. تتميز بكتريا *K.pneumoniae* بانها سالبة لفحص الأوكسيديز Oxidase والاندول Indol واحمر المثيل Red Methyl، موجبة لفحص الكتاليز catalase والفوكس بروسكاور، ولها القدرة على استهلاك السترات Citrate، كما أنها تنتج أنزيم اليوريز Urease و Lysine decarboxylase ولا تنتج Ornithine decarboxylase وكذلك غير منتجة لغاز كبريتيد الهيدروجين H₂S. بكتريا *K.pneumoniae* لها القدرة على تمثيل كل من السكريات D-1-O-، 4-Hydroxybenzoate، D-Glucuronate، D-Galacturonate، Alanine، D-Sorbitol، D-Saccharate، Lactulose، Maltitol، Methyl-B-galactoside، Quinate، Protocatechuate، Palatinose، Mucate و L-Rhamnose.

(Sharmeen et al ., 2012 ; Brenner et al., 2005).

1-1-1-2-2 وبائية بكتريا *K.pneumoniae*

تتواجد بكتريا *K.pneumoniae* بشكل واسع الانتشار في الطبيعة لاسيما في التربة والماء وعلى النباتات، كما تتواجد كفلورا طبيعية في الفم والجلد والامعاء (Ryan and Ray, 2004; Sharmeen et al., 2012)، وكذلك تواجدها على السطوح المخاطية في اللبائن مثل الانسان والخيول والخنائير التي تعد بيئات مناسبة لنموها وتمائل في ذلك كل من الجنسين *Citrobacter* و *Enterobacter* ولا تماثل *E.coli* او *Shigella spp.* التي تكون شائعة في الانسان (Podschun and Ullman, 1998)، وفي الولايات المتحدة الامريكية لوحظ ان بكتريا *K.pneumoniae* التي تمتلك انزيمات Carbapenemases التي تدعى *Klebsiella pneumoniae Carbapenemases (KPC)* تسبب زيادة حدوث الاصابات السريرية، ومع ذلك فأن استعمار تلك البكتريا او انتشارها يعتمد على طول او قصر مدة الرقود للمرضى في مستشفيات العناية الحادة ووحدات العناية المركزة (Line et al., 2013). ان بكتريا *K.pneumoniae* التي تمتلك انزيمات Carbapenemases تنتشر عبر البلدان بالرغم من توسع انتشارها الا انها تختلف باختلاف الموقع الجغرافي، والبكتريا المنتجة لهذه الانزيمات تتأثر تأثيراً قليلاً بالمضادات الحيوية مما يؤدي الى زيادة الوفيات عند المرضى المصابين بمجرى الدم نتيجة اصابتهم ببكتريا (Kpc)

Klebsiella pneumoniae carbapenemase

(Munoz-Price et al., 2013).

ان من بين الاسباب الرئيسة لانتشار بكتريا *K.pneumoniae* في المستشفيات هو استقرارها في القناة المعوية المعوية للمرضى الراقدين في المستشفى ووحدات العناية المركزة وايدي العاملين بالعناية الصحية، فضلاً عن الأجهزة الطبية التي تعد مستودعاً للبكتريا (Debby et al., 2012)، فضلاً عن الاستعمال المتكرر للأجهزة الطبية التي تكون على تماس مباشر مع سوائل الجسم بين المرضى الراقدين في المستشفيات مما يؤدي الى زيادة الاصابات

الناتجة من خلال قيام بكتريا *K.pneumoniae* بتكوين الاغشية الحيوية على تلك الاجهزة وتعزيز مقاومة المضادات الحيوية (Singhai et al., 2012).

2-1-1-2-2 Pathogenesis الامراضية

تعد بكتريا *K.pneumoniae* ممرض انتهازى، مسبباً رئيساً لذات الرئة المكتسبة بالمستشفيات، تعفن الدم، التهاب المسالك البولية لاسيما في الأطفال حديثي الولادة، مرضى سرطان الدم، وتصيب الأشخاص المصابين بضعف الجهاز المناعي ومرضى السكري، وعلى الرغم من استعمال المضادات الحيوية المناسبة، تسبب بكتريا *K.pneumoniae* تجرثم الدم وذات الرئة بنسبة تتجاوز 50% (Ahmed et al., 2012 ; Paczosa and Mecsas, 2016)، فضلاً عن تكوين الأغشية الحيوية على الأجهزة الطبية مثل أنابيب القثطرة والتي لها دور مهم في تطور عدد من الإصابات المكتسبة بالمستشفيات (Schroll et al., 2010).

تسبب بكتريا *K.pneumoniae* خراج الكبد القبيحي، السحايا، اللفافة الناخرة Necrotizing fasciitis وداء التهاب باطن مقلة العين Endophthalmitis، وتستغل بكتريا *K.pneumoniae* عدداً من عوامل ضراوتها مثل عديد السكر للمحافظة، عديد السكر الدهني، الخمل، بروتينات الغشاء الخارجي، ومحددات استحواذ الحديد للبقاء وغزو المناعة خلال الإصابة (Li et al., 2014)، فضلاً عن ذلك تسبب بكتريا *K.pneumoniae* التهاب نقي العظام Osteomyelitis (Lee et al., 2017).

3-1-1-2-2 Virulence factors عوامل الضراوة

تمتلك بكتريا *K.pneumoniae* العديد من التراكيب التي تعد ضرورية لضراوتها تتضمن الأهلاب Pilli التي تساعد في بدء استعمار المضيف، وعديد السكر الدهني Lipopolysaccharide، وعديد السكريد للمحافظة Capsular polysaccharide التي تحمي البكتريا من البلعمة والمتمم وتنشط تمايز الماكروفيج (Alcantar-Curiel et al., 2013)، فضلاً

عن ذلك اشارت دراسة (Cruz-Cordova *et al.* (2014) أن امراضية بكتريا *K.pneumoniae* تحدث بسبب امتلاكها لتلك العوامل التي تسمح لها بالتهرب من الجهاز المناعي وامتلاكها اللواصق Adhesins وأنظمة الحصول على الحديد Iron acquisition systems ومقاومة المصل Serum resistance وتكوين الغشاء الحيوي Biofilm formation.

Fimbriae الخمل 1-3-1-1-2-2

تمتلك بكتريا *K.pneumoniae* ما لا يقل عن ثلاثة انواع من الخمل؛ الخمل من النوع الاول Type 1 fimbriae، الخمل من النوع الثالث Type 3 fimbriae (Struve *et al.* (2009) وخمل Kp (a-g) fimbriae فضلاً عن اللاصق Kpf (Wu *et al.*, 2010)

Type 1fimbriae (T1f) الخمل من النوع الاول 1-1-3-1-1-2-2

يمتاز خمل النوع الاول كونه زوائد خيطية نحيفة صلبة بارزة من منطقة الغشاء الساييتوبلازمي، تتألف من وحدات فرعية متكررة تدعى FimA مع جزء لاصق بالقمة يدعى Fim H (Li *et al.*, 2014). ان التصاق بكتريا *K.pneumoniae* بالخلايا الطلائية حقيقية النواة يعود لأمتلاكها الخمل من النوع الاول الحساسة للمانوز (Alcantar-Curiel *et al.*, 2013). وتمتلك جيناً فريداً يسمى *fim K* يقع بعد *fimH* اذ يعمل كمنظم استتساخ لجزء من منطقة الاوبيرون (fimBEAICDFGHK) (Wang *et al.*, 2013). يلتصق الخمل من النوع الاول لبكتريا *K.pneumoniae* بالتراكيب الحاوية على المانوز الموجودة على خلايا المضيف او المواد الخارج الخلوية عبر اللاصق Fim H (Rosen *et al.*, 2008)، واوضحت الدراسات ان الخمل من النوع الاول لبكتريا *K.pneumoniae* هي ضرورية لبدء التهاب المسالك البولية، لكن لا تمتلك تأثيراً في قابلية بكتريا *K.pneumoniae* لاستعمار الامعاء او الرئة (Struve *et al.*, 2008) في حين أشار Gerlach *et al.* (1989) دور الخمل الذي يعود الى النوع الأول في الالتصاق مع خلايا الأمعاء.

2-1-3-1-1-2-2 Type3 fimbriae (T3f) الخمل من النوع الثالث

تمتلك بكتريا *K.pneumoniae* الخمل من النوع الثالث، وهي زوائد عرضها 2-4 نانومتر وطولها 0.5-2 مايكرومتر (Li *et al.*, 2014) وتعد مقاومة لسكر المانوز، لها جين يدعى *mrk A* الذي يشفر الى وحدة فرعية لتكوين الساق الحلزوني (Langstraat *et al.*, 2001) ، فضلاً عن وحدة فرعية لاصقة لها القدرة على الارتباط بجزيئات الكولاجين النوع الرابع والخامس على سطح خلايا المضيف التي يشفر لها جين يدعى *mrk D* وتقع بقمة الخمل (Sebghati *et al.*, 1998).

اما جينات *mrk B*، *mrk C* و *mrk F* التي تشفر عن بروتينات Chaperone، Usher و Scaffolding، المسؤولة عن تجمع وتنظيم واستقرار الخمل (Paczosa and Meccas, 2016; Stahlhut *et al.*, 2012; Langstraat, 2001) يلتصق خمل النوع الثالث بالخلايا الطلائية وانسجة الكلى والرئة (Stahlhut *et al.*, Struve *et al.*, 2009) (2012; Paczosa and Meccas, 2016) اما التصاقها في انسجة الامعاء والرئة غير معروف (Paczosa and Meccas, 2016; Langstraat *et al.*, 2001) وللخمل دوراً كبيراً في تكوين الغشاء الحيوي، فضلاً عن دوره في أحداث التهابات المسالك البولية وتكوين الغشاء الحيوي على أنابيب القنطرة البولية (Li *et al.*, 2014).

اشار (Alcantar-Curiel *et al.*, 2013) ان خمل النوع الثالث لا يعتمد على D-Mannose لتعزيز الالتصاق بالخلايا الطلائية للقصبه الهوائية، الخلايا النيببية الكلوية، بروتينات الحشوية الخارج الخلوية والاعشوية القاعدية لأنسجة الرئة. يعد الجين *mrk D* المحمول على البلازميدات نادراً في سلالات *K.pneumoniae* في حين تمتلك جيناً محمولاً كروموسومياً (Sebghati *et al.*, 1998)، وهو يعتمد على حامض التانيك Tannic acid الذي

يتوسط الارتباط بالانسجة حقيقية النواة والالتصاق بالحشوة الخارج الخلوية (Alcantar-Curiel *et al.*, 2013)

Kpc Fimbriae خمل 3-1-3-1-1-2-2

تمتلك بكتريا *K.pneumoniae* خملاً آخر يدعى Kpc وتخلق بوساطة Kpc ABCD وتكون ذات صلة بالسلالة *K.pneumoniae* المخاطية عالية اللزوجة وتسمى أيضاً KpcA , KpcB, KpcC, KpcD, KpcE, KpcF, KpcG ويعد KpcA الوحدة الفرعية الرئيسية المكونة للخمل، ولها دور في تكوين الغشاء الحيوي لبكتريا *K.pneumoniae* (Wu *et al.*, 2010) مشيراً أيضاً الى وجود نوع KpcS.

KPF-28 Adhesin اللاصق 4-1-3-1-1-2-2

يتألف هذا الخمل من بروتين Fimbrin ذي وزن جزيئي 28 كيلو دالتون وهو طويل، نحيف ومرن، قطره حوالي 4-5 نانومتر وطوله 0.5-2 مايكرومتر، ويتواجد في السلالات *K.pneumoniae* الحاملة للبلازميد المقاوم R الذي يشفر الى انزيمات البيبتالاكتاميز واسعة الطيف نوع CAZ/ SHV (Dimartino *et al.*, 1996)، وأشار (Bure *et al.*, 1988) الى ان سلالات *K.pneumoniae* المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية تمتلك بلازميد CAZ-4/SHV-5 و KPF-28 التي لها علاقة في احداث الوبائية في المستشفيات في فرنسا.

يمكن ان يشفر للتعبير عن جين *kpf-28* في كروموسوم بكتريا *K.pneumoniae*، ويمكن للخمل KPF-28 ان يساعد على التصاق *K.pneumoniae* بخطوط خلية Caco-2 وهذا يشير بان الخمل قد تكون عوامل لاستعمار امعاء اللبائن، وان 83 % من عزلات بكتريا *K.pneumoniae* ذات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية تمتلك الخمل KPF-28 (Dimartino *et al.*, 1996).

2-3-1-1-2-2 Capsule polysaccharide (Cps) المحفظة

تمتلك بكتريا *K.pneumoniae* ما لا يقل عن 78 نمطاً مصلياً للمحفظة (مستضد K)، وتعد الانماط K1 و K2 اكثر الانماط ضراوة، تمتلك بكتريا *K.pneumoniae* محفظة متكونة من ثلاثة الى ستة من السكريات الحامضية (Li et al., 2014)، ويعد جين *wzy* هو المسؤول عن تخليق مسارات بلمرة المحفظة (Reid and Szymanski, 2009)، وان اللزوجة المفرطة لبعض سلالات بكتريا *K.pneumoniae* يعود الى زيادة انتاج عديد السكر للمحفظة Capsule polysaccharide (Cps) التي تعد احد عوامل الضراوة لبكتريا *K.pneumoniae* ويتم التعرف من خلال اللزوجة المخاطية للمستعمرات النامية على الاوساط الصلبة (Shon et al., 2013).

ومن الجدير بالذكر ان وجود محفظة سميكة على سطح الخلية تحمي بكتريا *K.pneumoniae* من البلعمة التي تحدث بوساطة الماكروفيج، الخلايا العدلة Neutrophils والخلايا الشجيرية Dendritic cells (Evrard et al., 2010; Cortes et al., 2002) (Pan et al., 2011).

3-3-1-1-2-2 عديد السكر يد الدهني Lipopolysaccharide

تمتلك بكتريا *K.pneumoniae* طبقة العديد السكر يد الدهني (LPS) الذي يتكون من ثلاث مناطق Lipid A الكارة للماء والمتواجد في الغشاء الخارجي والمستضد الجسمي O-antigen كمن أبعاد للـ LPS واللب Core polysaccharide الذي يربط LipidA و O-antigen (Li et al., 2014).

1. المستضد الجسمي O-Antigen

تمتاز بكتريا *K.pneumoniae* بامتلاكها ما لا يقل عن تسع مجاميع للـ O-antigen هي (O1، O2، O2ac، O3، O4، O5، O7، O8 و O12)، والمستضد

O1 هو النمط المصلي الأكثر شيوعاً بين العزلات السريرية لبكتريا *K.pneumoniae* (Hansen, et al., 1999). والأكثر انتشاراً في السلالات التي تغزو الأنسجة (Hsieh et al., 2012)، ويمثل مستضد O دوراً في حماية بكتريا *K.pneumoniae* من البلعمة ومن ثم مقاومة البكتريا عملية القتل التي يتوسطها المتمم (Paczosa and Mecsas, 2016)، والالتصاق بالخلايا الطلائية البولية واستعمار المسالك البولية في الفئران المصابين بالتهاب الاحليل (Merino et al., 2000).

2. اللب Core polysaccharide

تمتلك بكتريا *K.pneumoniae* نوعين من اللب يشفر له بوساطة مجموعة جينات تدعى *wa cluster* (Regue et al., 2005 ; Fresno et al., 2007).

3. Lipid A

يخلق Lipid A في سايتوبلازم الخلايا بوساطة مجموعة من الإنزيمات الأساسية ثم ينقل بوساطة نواقل ABC transporter وصولاً إلى الغشاء الخارجي، تحدث خلال نقل LipidA تحويرات تساهمية بوساطة أنزيمات محورة بفعل محفزات بيئية تعمل هذه التحويرات على زيادة ضراوة Lipid A في العائلة المعوية (Raetz et al., 2007)، إذ يعمل LipidA المحور على مقاومة بكتريا *K.pneumoniae* للبيبتيدات المضادة للبكتريا، وان حدوث طفرة في الجينات المسؤولة عن الانزيمات تؤدي الى تضعيف ضراوة *K.pneumoniae* عند اختبارها في نماذج حيوانية مختلفة (Llobet et al., 2011; Clements et al., 2007).

2-2-1-3-4 بروتينات الغشاء الخارجي (OmpA) Outer membrane proteins

OmpA هو احد بروتينات الغشاء الخارجي الرئيسة للبكتريا السالبة لصبغة كرام في العائلة المعوية وله دوراً في منع تنشيط الخلايا الطلائية عبر التأثير في المسالك المعتمدة على NF-KB، p38 و p44/42 ومن ثم توهين الاستجابة الالتهابية التي تتوسط الخلايا الطلائية (Li

(2014, *et al.*)، وان فقدان OmpA تجعل بكتريا *K.pneumoniae* اكثر تأثراً في الببتيدات المضادة للمايكروبات (Llobet *et al.*, 2009).

هناك دراسات تشير الى ان OmpA يساهم في تنشيط انظمة غير معروفة تعمل على تقليل السمية الخلوية للببتيدات المضادة للمايكروبات (Li *et al.*, 2014)، فضلاً عن انها تساهم في مقاومة عملية البلعمة (March *et al.*, 2013).

هناك عوامل ضراوة أخرى تمتلكها بكتريا *K.pneumoniae* مثل حاملات الحديد Iron acquisition التي تعد ضرورية للنمو البكتيري في جسم الكائن الحي، إذ ان هناك ما لا يقل عن 12 نظام امتصاص للحديد مميزة في بكتريا *K.pneumoniae*، وتنتج بكتريا *K.pneumoniae* حاملاً حديداً نموذجياً يسمى Enterobactin الذي يمتلك الفة عالية للحديد وكذلك تمتلك انزيم اليوريز السايوتوبلازمي من اجل تحلل اليوريا الى امونيا وثاني اوكسيد الكربون كمصدر للنايتروجين لغرض النمو (Li *et al.*, 2014).

2-2-1-1-4 مقاومة بكتريا *K.pneumoniae* للمضادات الحيوية

أشارت الدراسات إلى مقاومة بكتريا *K.pneumoniae* للعديد من المضادات الحيوية وذلك لامتلاكها العديد من آليات المقاومة منها مقدرتها على إنتاج أنزيمات البيبتالاكتاميز، أنزيمات البيبتالاكتاميز واسعة الطيف، أنزيمات الكاربابينيمز، وكذلك قدرة البكتريا على تحويل نفاذية أغشية الخلية التي تؤدي إلى التغيرات في أنظمة مضخات الدفع ولاسيما KpnEF و AcrAB-Tolc (Ghafourian *et al.*, 2015; Marsik and Nambiar, 2011)؛ ومن آليات المقاومة الأخرى لبكتريا *K.pneumoniae* (Navon-Venezia *et al.*, 2017)، الطفرات في موقع الهدف الجيني، الطفرات الكروموسومية واستبدال المسارات الأيضية المحمولة على البلازميد oqxAB (Ho *et al.*, 2016; Huovinen, 1995). (Navon-Venezia *et al.*, 2017).

Adhesion 5-1-1-2-2 الالتصاق

تمتلك بكتريا *K.pneumoniae* القدرة على الالتصاق على مختلف انواع السطوح الحية كخلايا الأمعاء والأنسجة الحية الأخرى إذ يعد ذلك الخطوة الأولى لاستعمار وإصابة تلك الأنسجة ومن ثم انتشارها واحداث الأمراض، فضلاً عن الالتصاق على السطوح غير الحية كالأجهزة الطبية مثل أنابيب القثطرة البولية والأرضيات والجدران، كما تلتصق مع الخلايا الأخرى مكونة الغشاء الحيوي Biofilm وهناك العديد من الآليات لحدوث الالتصاق في البكتريا (Johnson, 2011)، ولكن الآلية الأكثر شيوعاً في بكتريا *K.pneumoniae* هي دور الخمل، ويقسم الخمل المرتبط بعملية الالتصاق في البكتريا إلى أنواع مختلفة ولكن الخمل السائد الذي يؤدي دوراً مهماً كعامل التصاق في بكتريا *K. pneumoniae* يعود إلى النوع الأول (T1f) والنوع الثالث (T3f) (Podschun and Ullman, 1998)، إذ يكون الخمل الذي يعود إلى النوع الأول مسؤولاً عن الالتصاق مع خلايا الأمعاء والكلية والمثانة البولية، وأن حصول طفرات في جين *fim* الذي يشفر الى بروتين التصاق الخمل الذي يعود الى النوع الأول يؤدي إلى تغيير الصفات الالتصاقية للبكتريا وينتج عن ذلك تكون سلالة جديدة تختلف نسبياً عن السلالة الأصلية من ناحية خصائصها الالتصاقية (Gerlach et al., 1989). أما النوع الثالث من الخمل فتكون أهميته بالدرجة الأساس في الالتصاق مع السطوح الحية وغير الحية وتكوين الغشاء الحيوي داخل وخارج الجسم (Johnson, 2011).

Biofilm 6-1-1-2-2 الغشاء الحيوي

يعد الغشاء الحيوي أحد عوامل ضراوة بكتريا *K. pneumoniae* ويتمثل الغشاء بتجمع الخلايا البكتيرية والتصاقها على السطوح الحية وغير الحية منتجة طبقة سميكة من الغشاء الحيوي الخارج خلوي الذي يعمل على حماية الخلايا من البلعمة بوساطة الجهاز المناعي للمضيف، وإزالة تأثير الخلايا الطلائية، والمضادات الحيوية (Seifi et al., 2016; Schroll et al., 2010)

بكتريا *K. pneumoniae* على تكوين الغشاء الحيوي على الأجهزة الطبية كأنايب القثطرة التي تمثل دوراً رئيساً في تطور الإصابات المكتسبة بالمستشفيات التي تتضمن التهابات المسالك البولية القثطارية Catheterized associated urinary tract infection (CAUTI) (Schroll *et al.*, 2010).

أشارت دراسة Zheng *et al.* (2018) إلى قدرة بكتريا *K.pneumoniae* على تكوين الغشاء الحيوي، فضلاً عن دور عدد من جينات عوامل الضراوة على تكوينه ويساهم في استقرار وبقاء إصابات بكتريا *K.pneumoniae*، وأظهرت دراسة Stahlhut *et al.* (2012) بأن الخمل من النوع الأول والثالث التي تمتلكها بكتريا *K.pneumoniae* لهما دوراً مهماً في تحفيز تكوين الغشاء الحيوي على القثطرة البولية في نموذج المثانة القثطارية عند المرضى المصابين بالتهاب المسالك البولية، في حين أشارت دراسة Schroll *et al.* (2010) بأن الخمل من النوع الأول لا يمتلك دوراً في تكوين الغشاء الحيوي.

2-2-2 الأنواع البكتيرية الأخرى

1-2-2-2 بكتريا *Proteus hauseri*

بكتريا *Proteus* سالبة لصبغة كرام، عصوية قصيرة، لاهوائية اختيارية متحركة بوساطة اسواط محيطية، عضوية التغذية، تنمو بدرجة حرارة 37م، واسعة الانتشار في الطبيعة، اذ توجد في الماء الملوث والتربة والمواد العضوية المتحللة من اصل حيواني، كما تتواجد في امعاء الانسان والحيوان، وتستوطن القناة البولية اذ تسبب التهابات المسالك البولية فتعد ممرضاً انتهازياً (Rozalski *et al.*, 2012; Manos and Belas, 2006) Opportunistic pathogen (Drzewiecka, 2016; Kwil *et al.*, 2013;). تنمو بكتريا *Proteus* على اوساط زرعية مختلفة اذ تنمو على وسط اكار الماكونكي مكونة مستعمرات ذات الوان كونها غير مخمرة لسكر اللاكتوز وهي ايضاً غير مخمرة لسكر السكروز ومخمرة لسكر الكلوكوز، حالة للجيلاتين، سالبة لفحص الاوكسيديز، وموجبة لفحص الاندول والكتاليز واحمر المثل وذات نتيجة متغايرة

لاستهلاك السترات ونتاجها انزيم اليوريز Urease ومنتجة لغاز كبريتيد الهيدروجين H_2S (Levinson, 2016; Manos and Belas, 2006).

تمتلك بكتريا *Proteus* العديد من عوامل الضراوة منها: الخمل *Fimbriae*، الاسواط *Flagella*، انزيم *Amino acid deaminase*، انزيم *Protease*، حالات الدم *Hemolysins*، امتلاكها عديد السكر الدهني *LPS* والذيفان الداخلي *Endotoxin* واحداثها ظاهرة العج *Swarming*، وتكوين الغشاء الحيوي *Biofilm* (Kwil et al., Rozalski et al., 2012) (2013).

2-2-2-2 الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa*

بكتريا *P.aeruginosa* هي سالبة لصبغة كرام، عصوية، هوائية مجبرة، متحركة بواسطة سوط قطبي تنمو بدرجة حرارة 37-42 م° والحرارة المثلى 37 م°، واسعة الانتشار في الطبيعة، اذ تتواجد في التربة، الماء، النباتات والحيوانات، فضلاً عن تواجدها في البيئات الرطبة بالمستشفيات. كما تتوطن في القناة البولية للانسان وتسبب التهابات المسالك البولية فهي من الممرضات الانتهازية بعد بكتريا *E.coli*، و تتواجد باعداد قليلة كنبيت طبيعي في الامعاء وعلى جلد الانسان، تنمو بكتريا *P.aeruginosa* على عدد من الاوساط الزرعوية ومنها وسط الماكونكي، اذ تظهر بشكل مستعمرات عديمة اللون، لعدم تخميرها سكر اللاكتوز، كما انها غير مخمرة للكربوهيدرات، وعدد من سلالات بكتريا *P.aeruginosa* تقوم بأكسدة الكلوكوز، تنتج بكتريا *P.aeruginosa* عدد من الصبغات منها صبغة *Pyocyanin* وهي خضراء مزرققة وصبغة *Pyoverdin* المتفلورة وهي خضراء اللون، وصبغة *Pyorubin* الحمراء وصبغة *Pyomelanin* السوداء (Brooks et al., 2013).

تمتلك بكتريا *P.aeruginosa* عدداً من عوامل الضراوة منها الخمل *Fimbriae* و عديد السكر الدهني *LPS* والمحفظة التي تمتلك عديد السكر *Exopolysaccharide* المسؤولة عن

المستعمرات المخاطية وتنتج عدداً من الانزيمات مثل Elastases و Proteases والسموم مثل Hemolysins وتنتج Exotoxin A الذي يسبب تنخر الأنسجة وقاتل للحيوانات (Cornelissen *et al.*, 2015; Brooks *et al.*, 2013).

***Escherichia coli* 3-2-2-2**

بكتريا *E.coli* هي عصيات قصيرة سالبة لصبغة كرام، لا هوائية اختيارية، متحركة بواسطة اسواط، تنمو على وسط الماكونكي مكونة مستعمرات وردية كونها مخمرة لسكر اللاكتوز، فضلاً عن كونها مخمرة للكوكوز والمانتول، موجبة لفحص الكتاليز والانحول، ومنتجة أنزيم Lysine decarboxylase، في حين تكون سالبة لفحص الاوكسيديز، تمتلك بعضاً من عوامل الضراوة منها الخمل Fimbriae والاسواط Flagellae والمحفظة Capsule ومنتجة لبعض السموم منها Enterotoxins, Exotoxins و Hemolysin، تتواجد في الخلايا الطلائية للأمعاء وتغزو تلك الخلايا مسببة Dysentery، الحمى وخروج دموي لا سيما في الاطفال وكذلك تغزو المسالك البولية والكلية مسببة التهاب المسالك البولية (UTI) لذا تعد مُمرضاً انتهازياً (Cornelissen *et al.*, 2015 ; Brooks *et al.*, 2013).

***Enterobacter cloacae* 4-2-2-2**

بكتريا عسوية سالبة لصبغة كرام، لاهوائية اختيارية، غير مكونة للابواغ، متحركة وتمتلك محفظة Capsule، توجد بكتريا *E.cloacae* منتشرة بشكل واسع في الطبيعة وهي ايضاً من الممرضات، وأغلبها عزلات من عينات سريرية، إذ تسبب معدل واسع من الاصابات المنتشرة بالمستشفيات مثل ذات الرئة Pneumonia، التهاب المسالك البولية UTI والتهابات الجروح، واغلب سلالاتها تمتلك انزيمات Beta-lactamase محمولة على الكروموسومات تسمى Ampicillin C (AMPC) (Davin-Regli and Pages, 2015 ; Brooks *et al.*, 2013).

تنمو بكتريا *E.cloacae* على وسط الماكونكي بمستعمرات وردية كونها مخمرة لسكر اللاكتوز، وأيضاً مخمرة لسكر السكروز والمانيتول، تعطي فحصاً سالباً للأوكسيديز والأندول وأحمر المثل، وموجبة لفحص اليوريز والسترات والكتاليز، وغير منتجة لكبريتيد الهيدروجين H_2S (Brooks et al., 2013). تمتلك بكتريا *E.cloacae* عدداً من عوامل الضراوة مثل الخمل، اللواصق، المحفظة وعديد السكر الدهني (Sanders and Sanders, 1997)، ولها القدرة على افراز السموم الخلوية مثل Enterotoxin ، Hemolysin و Pore-forming toxins (Davin-Regli and Pages, 2015).

5-2-2-2 بكتريا *Klebsiella oxytoca*

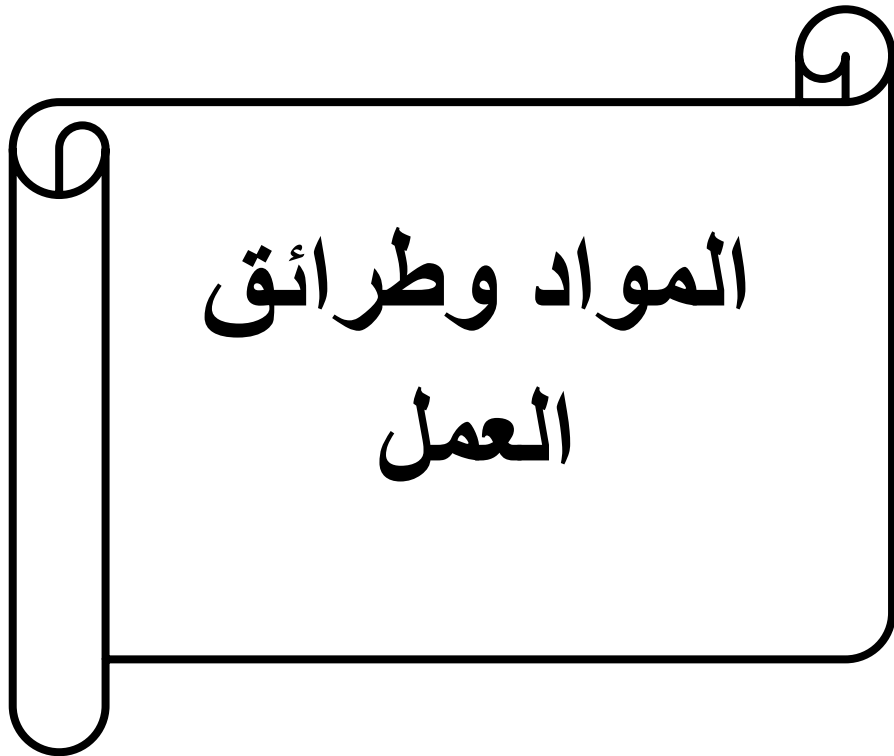
بكتريا عصوية الشكل سالبة لصبغة كرام، لا هوائية اختيارية، غير متحركة وتمتلك محفظة، توجد بكتريا *K.oxytoca* بشكل طبيعي في الأمعاء الدقيقة للإنسان والحيوان، الماء والترية، وهي أيضاً من الممرضات الانتهازية، وأغلب عزلاتها من عينات سريرية من الخروج والجلد والأغشية المخاطية والبلعوم، إذ تسبب معدلاً واسعاً من الإصابات المكتسبة بالمستشفيات مثل ذات الرئة Pneumonia، التهاب المسالك البولية UTI وتسمم الدم Septicaemia واستعمار القناة المعوية المعدية والتهاب الأمعاء، تمتلك أنزيمات البييتالاكتاميز واسعة الطيف Extended Spectrum Beta-Lactamase، وأنزيمات الكاربابينيميز Carbapenemase التي تكون محمولة على البلازميدات وكذلك تمتلك أنزيمات الأمينوكلايكوسايد المحورة وأنزيمات البييتالاكتاميز المعدنية Metallo Beta-Lactamase (Singh et al., 2016; Trivedi et al., 2015; Darby et al., 2014).

تنمو بكتريا *K.oxytoca* على وسط الماكونكي بمستعمرات وردية كونها مخمرة لسكر اللاكتوز وأيضاً مخمرة لسكر الكلوكوز، مسيلة للجيلاتين، تعطي فحصاً سالباً للأوكسيديز وأحمر

المثيل، وموجبة لفحص الكتاليز والسترات والأندول والفوكس بروسكاور واليوريز، وغير منتجة لغاز H_2S على وسط KIA (Singh et al., 2016 ; Brenner et al., 2005).

تمتلك بكتريا *K.oxytoca* عدداً من عوامل الضراوة مثل الخمل، اللواصق، المحفظة والسموم كما في Tillivaline الذي يعود إلى عائلة Pyrrolbenzodiazepines (PBD) وهذا السم حساس للحرارة لكن مقاوم لأنزيمات الهضم بواسطة أنزيمات Proteinases، انتاج السم مرتبط بضراوة *K.oxytoca* الذي يسبب الموت المبرمج للخلايا الطلائية المعوية وتحطيم الخلايا الطلائية (Ghasemian et al., 2018).

الفصل الثالث



3- المواد وطرائق العمل Materials and methods

3-1 المواد Materials

3-1-1 الأجهزة والأدوات المختبرية Laboratory equipment and instruments

جدول (1-3): الاجهزة والأدوات المختبرية المستعملة في الدراسة.

الشركة المصنعة (المنشأ)	الجهاز
Webco (Germany)	Autoclave مؤصدة
Local Market (China)	Balance ميزان
AFCO (Jordan)	Cotton swab مسحات قطنية
Bio Merieux (France)	Densichek TM جهاز العكورة الخاص بالفايتك
Canon (USA)	Digital Camera كاميرا رقمية
DLTG (China)	Electrical oven فرن كهربائي
Thermo scientific (USA)	Gel electrophoresis جهاز الترحيل الكهربائي
-----	أنابيب وبيكرات وفلاسكات زجاجية Glassy universal tubes
Stuart (UK)	مسخن حراري ممغنط Hot plate and magnetic stirrer
Germany	Incubator حاضنة
Labtech(Korea)	Laminar flow clean bench كابينة الزرع
Kruss (Germany)	Light microscope مجهر ضوئي
Himedia (India)	Loop ناقل
Takashima (Japan)	Cooled centrifuge جهاز الطرد المركزي
AFMA (Jordan)	أطباق معايرة تحتوي على 96 حفرة Microtiter plates 96 wells
Brand – W (Germany)	Micropipettes ماصات دقيقة بأحجام مختلفة
AFCO (Jordan)	Millipore filter وحدات الترشيح الدقيقة
Biozek (Switzerland)	Petri dishes أطباق بتري
AFCO (Jordan)	P-line tubes أنابيب مختبرية
Biorad (USA)	Thermal cycler جهاز التدوير الحراري

Kelon (Korea)	Refrigerator	ثلاجة
Denver (Germany)	Sensitive electric balance	ميزان كهربائي حساس
Major science (Taiwan)	UV- Transilluminator	مصدر للأشعة فوق البنفسجية
BioMerieux (France)	Vitek – 2 Compact system	جهاز فايترك 2-
Griffin (England)	Vortex	مازج
Local Market (China)	Water bath	حمام مائي

Chemical materials 2-1-3 المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة

جدول (2-3) المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة

الشركة المصنعة (المنشأ)	المادة	
Oxoid (England)	Agar – Agar	أكار – أكار
Promega (USA)	Agarose	الأكاروز
BDH (England)	Hydrogen peroxide	بيروكسيد الهيدروجين
BDH (England)	Glycerol	كليسيرول
Sigma (Germany)	Sucrose	السكروز
BDH (England)	Sodium chloride	كلوريد الصوديوم
BDH (England)	Potassium chloride	كلوريد البوتاسيوم
BDH (England)	Sodium citrate	سترات الصوديوم
BDH (England)	Citric acid	حامض الستريك
BDH (England)	Sodium monohydrogen phosphate	فوسفات الصوديوم أحادي الهيدروجين
BDH (England)	Potassium dihydrogen phosphate	فوسفات البوتاسيوم ثنائي الهيدروجين
BDH (England)	Dextrose	دكستروز
-----	Tetramethyl-P-Phenylendiamine Dihydrochloride	
BDH (England)	Mannose	المانوز
CDH (UK)	Urea	اليوريا

3-1-3 الأوساط الزرعية الجاهزة Ready made culture media

جدول (3-3) الأوساط الزرعية المستعملة في الدراسة.

الشركة المصنعة (المنشأ)	الوسط الزرعى
Oxoid (England)	وسط نقيع القلب والدماغ السائل Brain – Heart infusion broth
Oxoid (England)	وسط أكار أساس الدم Blood agar base
Oxoid (England)	وسط أكار الحديد ثنائي السكر Kligler iron agar
Oxoid (England)	وسط أكار الماكونكي MacConkey agar
.....	وسط سائل أحمر المثيل – فوكس يروسكاور Methyl Red - Voges proskauer
Oxoid (England)	وسط الأكار المغذي Nutrient agar
Himedia (India)	وسط ماء البيبتون Peptone water
Himedia (India)	وسط أكار السيمون سترات Simmon's citrate agar
Himedia (India)	وسط أكار أساس اليوريا Urea agar base

4-1-3 الصبغات والكواشف والمحاليل المستعملة في الدراسة

Dyes, reagents and solution

جدول (4-3) الصبغات والكواشف والمحاليل المستعملة في الدراسة.

الشركة المصنعة (المنشأ)	الصبغات والكواشف والمحاليل
Switzerland	محاليل صبغة كرام (صبغة البنفسج البلوري Crystal violet stain، صبغة السفرانين Safranin stain، الأيودين Iodine والكحول الأثيلي 96% Ethanol)
Promega (USA)	محلول دارئ الترحيل الكهربائي TBE Tris – Borate – EDTA buffer
Promega (USA)	صبغة بروميد الأثيديوم Ethidium bromide
Himedia (India)	كاشف كوفاكس Kovac's reagent
-----	كاشف أحمر المثيل Methyl red reagent
-----	كاشف فوكس - بروسكاور Voges proskauer (VP1,VP2)
Fluka (Switzerland)	صبغة الكونغو الأحمر Congo red

Kits 5-1-3 العدد الجاهزة

جدول (5-3) العدد المستعملة في الدراسة.

الشركة المصنعة (المنشأ)	العدة
Promega (USA)	عدة استخلاص DNA الجينوم البكتيري Wizard® Genomic purification kit وتشمل: (Cell lysis solution, Nuclei lysis solution, Protein Precipitation Solution, DNA rehydration Solution, Isopropanol, Ethanol (70%) , Nuclease free water and RNase A Solution)
Promega (USA)	100 – 1500 bp DNA ladder
Promega (USA)	عدة تفاعلات سلسلة البلمرة Go Taq® Green Master Mix PCR 2X وتشمل: (Taq DNA polymerase, dNTPs, MgCL ₂ and reaction buffers at optimal concentrations for efficient amplification of DNA templates by PCR) Go Taq® Green Master Mix contains two dyes (blue and yellow)
BioMerieux (France)	Vitek 2 GN Kit

Antibiotics 6-1-3 المضادات الحيوية

جدول (6-3) المضادات الحيوية المستعملة في جهاز الفايترك في قياس التركيز المثبط الأدنى.

الشركة المصنعة	الرمز	اسم المضاد
Bio Merieux (France)	AMX	Amoxicillin
	AMP	Ampicillin
	SAM	Ampicillin/Sulbactam
	PIP	Piperacillin
	CFZ	Cefazolin
	Fox	Cefoxitin
	CAZ	Ceftazidime
	CRO	Ceftriaxone
	FEP	Cefepime
	ETP	Ertapenem
	MEM	Meropenem
	AK	Amikacin
	GM	Gentamicin
	TM	Tobramycin
	CIP	Ciprofloxacin
	LVX	Levofloxacin
	NIT	Nitrofurantoin
SXT	Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	

Primers 7-1-3 البودئ

جدول (7-3) البودئ المستعملة في الدراسة

اسم الجين		Primer sequence تتابع البادئ	الناتج (bp)	المصدر
F	<i>fim A</i>	5'-CGG ACG GTA CGC TGT ATT TT-3'	500	(Alcantar-Curiel <i>et al .</i> , 2013)
R		3'-GCT TCG GCG TTG TCT TTA TC-5'		
F	<i>fim H</i>	5'-TGG TGG TCG ACC TCT CCA CGC AGA TTT TTT GCC-3'	576	
R		3'-TCA GCT GAA CGC CTA TCC CCT GCG CCG GCG AGG CGG-5'		
F	<i>mrkA</i>	5'-CGG TAA AGT TAC CGA CGT ATC TTG TAC TG-3'	498	
R		3'-GCT GTT AAC CAC ACC GGT GGT AAC-5'		
F	<i>mrkD</i>	5'-CTG ACG CTT TTT ATT GGC TTA ATG GCG C-3'	757	
R		3'-GCA GAA TTT CCG GTC TTT TCG TTT AGT AG-5'		

2-3 طرائق العمل Methods

1-2-3 التعقيم Sterilization

عقمت جميع الأوساط الزرعية في هذه الدراسة بالمؤسسة Autoclave عند درجة حرارة 121م وتحت ضغط 15 باوند /انج² ولمدة 15 دقيقة، وعقمت الأدوات الزجاجية باستعمال جهاز الفرن الكهربائي Oven بدرجة حرارة 180م لمدة ساعتين، أما المحاليل فقد عقت باستعمال وحدات الترشيح Millipore Filters ذات قطر 0.22 مايكروميتر لكونها تتلف بالحرارة العالية (Greenwood *et al.*, 2007).

2-2-3 تحضير المحاليل Solutions preparation:

1-2-2-3 محلول داريء الفوسفات الملحي Phosphate buffer saline

أذيب 0.8 غم من كلوريد الصوديوم و 0.1 غم من كلوريد البوتاسيوم و 1.15 غم من فوسفات الصوديوم احادية الهيدروجين و 0.2 غم من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين في 1000 مل من الماء المقطر وعقم بجهاز المؤسسة بدرجة حرارة 121م وضغط 15 باوند/انج² لمدة 15 دقيقة (Bosch *et al.*, 1980).

2-2-2-3 محلول السفير Alsever's solution

حضر بإذابة 0.8 غم من سترات الصوديوم و 2.05 غم من الدكستروز و 0.42 غم من كلوريد الصوديوم و 0.25 غم من حامض الستريك في 1000 مل من الماء المقطر وعقم بجهاز المؤسسة بدرجة حرارة 121م وضغط 15 باوند/ انج² لمدة 15 دقيقة (Bosch *et al.*, 1980)

3-2-2-3 Mannose solution محلول سكر المانوز

إذيب 1 غم من سكر المانوز في 100 مل من محلول داريء الفوسفات الملحي المحضر وفق الفقرة 1-2-2-3 وعقم بجهاز المؤصدة بدرجة حرارة 121 م° وضغط 15 باوند/ انج² لمدة 15 دقيقة (Bosch *et al.*, 1980).

3-2-2-3 Congo red stain محلول صبغة الكونغو الحمراء

حضر المحلول بإذابة 0.8 غم من صبغة الكونغو الحمراء في 1000 مل من الماء المقطر ثم عقم المحلول بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 م° وضغط 15 باوند/ انج² ولمدة 15 دقيقة (Freeman *et al.*, 1989).

3-2-2-3 Tris borate EDTA buffer محلول دارئ الترحيل

حضر المحلول المجهز من قبل شركة (Promega) بإضافة 25 مل من دارئ TBE بتركيز 40x إلى 975 مل من الماء المقطر المعقم للحصول على تركيز 1x من الدارئ في قنينة زجاجية معقمة ثم حفظ بدرجة حرارة 4 م° لحين الاستعمال.

3-2-2-3 Primers preparation تحضير البودائ

حضرت المحاليل الخزينة المجهزة من قبل شركة (Promega) وباستعمال الماء المقطر اللاأيوني المعقم للحصول على تركيز 100 مايكرو مول/ مايكرو ليتر، إذ تم تحضير محلول كل بادئ على انفراد بتركيز 10 مايكرو مول/ مايكرو ليتر بأخذ 10 مايكرو ليتر من المحلول الخزين لكل بادئ و اضافته إلى 90 مايكرو ليترأ من الماء المقطر اللاأيوني المعقم ومزج جيداً باستعمال جهاز المازج Vortex ثم حفظ في الثلاجة بدرجة حرارة 4 م° لحين الاستعمال، أما محاليل الخزينة للبودائ فقد حفظت عند درجة حرارة -20 م° مع مراعاة مزجها جيداً باستعمال المازج عند اخراجها من الثلج لغرض مجانستها قبل الاستعمال.

3-2-3 تحضير الكواشف Reagents preparation**1-3-2-3 كاشف الأوكسيداز Oxidase reagent**

حضر الكاشف بإذابة 1 غم من مادة Tetramethyl-P-Phenylenediamine Dihydrochloride في 100 مل من الماء المقطر وحفظ في قنينة زجاجية معتمة، استعمل هذا الكاشف للتحري عن قابلية البكتريا على انتاج أنزيم الأوكسيداز (Tadesse and Alem, 2006).

2-3-2-3 كاشف الكتاليز Catalase reagent

حضر كاشف بيروكسيد الهيدروجين بتركيز 3% بأخذ 1 مل من المحلول الأصلي بتركيز 30% واكمل الحجم الى 10 مل من الماء المقطر وحفظ الكاشف في قنينة معتمة. استعمل هذا الكاشف للتحري عن قابلية البكتريا لإنتاج انزيم الكتاليز (Tadesse and Alem, 2006).

4-2-3 تحضير الأوساط الزرعية Preparation of culture media**1-4-2-3 الأوساط الزرعية الجاهزة Ready-Made culture media preparation**

حضرت الاوساط الزرعية الجاهزة كوسط سائل أحمر المثل، فوكس بروسكاور Methyl Red، وسط آكار الحديد-ثنائي السكر Kligler iron agar، وسط آكار Red Voges-Proskauer، وسط آكار السيمون سترات MacConkey agar، وسط Brain-Heart infusion، وسط نقيع القلب والدماغ السائل Peptone water، و وسط الآكار المغذي Nutrient agar، حسب تعليمات الشركة المصنعة لها وقد عقت الأوساط الزرعية بالمؤصدة Autoclave وبعدها صبت الأوساط الزراعية في أطباق بتري وأنابيب وحضنت عند درجة حرارة 37م° ولمدة 24 ساعة للتأكد من عدم تلوثها.

2-4-2-3 Laboratory culture media الأوساط الزرعية التركيبية**1-2-4-2-3 Blood agar base وسط أكار الدم**

حضر الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة وعقم بالمؤصدة وبرد الى درجة حرارة 45م°
وبعدها أضيف له دم إنسان بنسبة 5% ثم صب في أطباق بتري المعقمة وترك ليتصلب
(Atlas, 2010).

2-2-4-2-3 Urea agar وسط أكار اليوريا

حضر الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة بإذابة 24.01 غم من وسط أكار اليوريا
الأساس في 950 مل من الماء المقطر المعقم ثم عقم الوسط بالمؤصدة وبرد الى درجة حرارة 50
م° ثم أضيف 50 مل من محلول اليوريا 40% (حضر بإذابة 40 غم في 100 مل من الماء
المقطر وعقم باستعمال وحدات الترشيح Millipore filter ذات القطر 0.22 مايكروميتر) وبعدها
صب الوسط في أنابيب معقمة.

3-2-4-2-3 Congo red agar media وسط أكار الكونغو الأحمر

حضر الوسط بإذابة 37 غم من وسط نقيع القلب والدماغ السائل، 50 غم من سكر
السكروز و15 غم من أكار- أكار في 900 مل من الماء المقطر ثم عقم الوسط بالمؤصدة وترك
ليبرد عند درجة حرارة 55م° ثم أضيف له 100 مل من محلول صبغة الكونغو الحمراء
المحضرة في الفقرة (3-2-2-4) وبعدها صب الوسط في اطباق بتري المعقمة (Freeman *et al.*, 1989).

5-2-3 جمع العينات Samples collection

جمعت 64 عينة سريرية من مستشفى حماية الأطفال بمدينة الطب ببغداد لأطفال مصابين بالتهاب الأمعاء التتخري تضمنت 41 عينة من الخروج Stool ، 14 عينة من الدم Blood و 9 عينات من البول Urine للفترة من 2018/1/29 إلى 2018/4/4.

6-2-3 زرع العينات Samples culture

زرعت العينات على وسط أكار الماكونكي وأكار الدم لغرض تشخيصها (Forbes et al., 2007).

7-2-3 تشخيص العزلات البكتيرية Bacterial Isolates Diagnosis

1-7-2-3 التشخيص المظهري Morphological Diagnosis

تم تشخيص العزلات النامية اعتماداً على الصفات المظهرية للمستعرات التي تتضمن لون المستعمرة (Forbes et al., 2007).

2-7-2-3 التشخيص المجهرى Microscopic diagnosis

حضرت مسحات من العزلات البكتيرية النامية على وسط أكار الماكونكي وأكار الدم وتم تصبيغها بصبغة كرام ثم فحصت تحت المجهر الضوئي على قوة تكبير 100 X لرؤية شكل الخلايا وترتيبها وألوانها تبعاً لتفاعلها مع صبغة كرام إذ ظهرت أغلب الخلايا على شكل عصيات سالبة لصبغة كرام (Levinson, 2016).

3-7-2-3 الاختبارات الكيموحيوية Biochemical tests

1-3-7-2-3 اختبار الأوكسيداز Oxidase test

نقل أحد المستعمرات النامية على وسط أكار الماكونكي بوساطة عود خشبي ثم وضعت على ورقة ترشيح Filter paper بعد ذلك أضيف إليها قطرة أو قطرتين من كاشف الأوكسيداز المحضر وفقاً للفقرة (1.3.2.3). إن تغير لون المستعمرة إلى اللون البنفسجي الغامق خلال 10

ثواني فهذا يعني إيجابية الاختبار، في حين عدم تغير اللون دلالة على أن البكتريا غير منتجة للأوكسيدز (Forbes *et al.*, 2007).

2-3-7-2-3 اختبار الكتاليز Catalase test

نقل أحد المستعمرات النامية على وسط أكار الماكونكي بواسطة عود خشبي معقم إلى شريحة زجاجية Glassy slide نظيفة ثم أضيف إليها قطرة من كاشف الكتاليز المحضر وفقاً للفقرة (2-3-2-3) فإذا ظهرت فقاعات هوائية فهذا يدل على إيجابية الاختبار (Tille, 2014).

3-3-7-2-3 اختبار الأندول Indol test

لقت أنابيب حاوية على وسط ماء البيبتون بمستعمرة بكتيرية ثم حضنت لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37م، ثم أضيف 0.3 مل لكل أنبوبة من كاشف كوفاكس Kovac's reagent وظهر حلقة حمراء (حلقة الأندول) عند سطح الوسط دليل على إيجابية الاختبار (Tille, 2014).

4-3-7-2-3 اختبار أحمر المثيل Methyl red test

لقت أنابيب حاوية على وسط سائل أحمر المثيل - فوكس بروسكاور بمستعمرة بكتيرية ثم حضنت الأنابيب لمدة 24 ساعة في درجة حرارة 37م ثم أضيف لكل أنبوبة 0.2 مل من كاشف أحمر المثيل Methyl red reagent وظهر اللون الأحمر دليل على إيجابية الفحص (Forbes *et al.*, 2007).

5-3-7-2-3 اختبار فوكس - بروسكاور Voges - Proskauer test

لقت أنابيب حاوية على وسط سائل أحمر المثيل - فوكس بروسكاور MR-VP بمستعمرة بكتيرية ثم حضنت الأنابيب لمدة 24 ساعة في درجة حرارة 37م، ثم أضيف لها 0.6 مل من المحلول الأول (VP1) الالف - نفتول Alph - Naphthol ثم 0.2 مل من المحلول الثاني

(VP2) لهيدروكسيد البوتاسيوم Potassium hydroxide ثم رجت الأنابيب جيداً، ولوحظت النتائج بعد 5 دقائق، ظهور اللون الأحمر دلالة على إيجابية الفحص (Tille, 2014).

3-7-2-3 اختبار استهلاك السترات Citrate utilization

أخذت إحدى المستعمرات البكتيرية النامية على وسط الماكونكي وزرعت بطريقة التخطيط على وسط أكار السيمون سترات ثم حضنت لمدة 24 ساعة في درجة حرارة 37م، وبعدها تغير لون الوسط من الأخضر إلى الأزرق مع وجود نمو دلالةً على إيجابية الفحص (Forbes et al., 2007).

3-7-2-3 اختبار السكريات على وسط Kligler iron agar

لحق قعر أنابيب حاوية على وسط أكار الحديد ثنائي السكر بالبكتريا بطريقة الطعن أولاً ثم التخطيط على السطح المائل ثم حضنت في درجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة، تغير لون الوسط في قعر الأنبوبة ولون الوسط المائل من الأحمر إلى اللون الأصفر يدل على تخمر الكلوكوز واللاكتوز وتغير لون الوسط في قعر الأنبوبة من الأحمر إلى الأصفر يدل على تخمر الكلوكوز فقط وتجمع الغاز وترسب أسود في قعر الأنبوبة يدل على إنتاج غاز CO_2 و H_2S (Tille, 2014).

3-7-2-3 اختبار اليوريز Urease test

لقت أنابيب حاوية على وسط أكار اليوريا المحضر وفقاً للفقرة (3-2-4-2-2) بتخطيط سطح الوسط المائل ثم حضنت لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37م، أن تغير لون الوسط من البرتقالي الفاتح إلى الوردي دليل على إيجابية الفحص، أجري الاختبار للتحرري عن قابلية البكتريا لإنتاج أنزيم اليوريز (Tille, 2014).

8-2-3 التشخيص بجهاز الفايترك Vitek – 2 Compact System

شخصت العزلات بمختبر الصحة المركزي باستعمال جهاز الفايترك Vitek – 2 ، إذ يتكون من مكونين أساسيين هما جهاز الكمبيوتر Computer والآلة Instrument والتي تتكون من خمسة مكونات أساسية وهي:

1. لوحة التحكم Keypad.

2. باب الملاء Fill door ويتم فيه انتقال العينة البكتيرية من أنبوبة كان Kan Tube إلى

داخل حفر العدة Kit بواسطة أنبوب ناقل موجود في العدة وتستمر هذه العملية 70 ثانية.

3. باب التحميل Load door ويتم فيه قطع الأنبوب الناقل المرتبط بالعدة وتحميل العدة يدوياً

إلى داخل الحاضنة وتستمر هذه العملية 3-5 دقيقة.

4. باب دخول أو وصول المستخدم User access door ويتم فيه التحضين وقياس التغيرات

التي تطرأ على العدة نتيجة لنمو البكتريا لاعطاء النتيجة.

5. باب النفايات Waste door ويتم فيه تجميع العدد Kits الملقحة بعد الانتهاء من التحاليل

واعطاء النتيجة لغرض اتلافها.

استعمل هذا الجهاز لتأكيد تشخيص العزلات البكتيرية من خلال عدة تشخيصية خاصة، إذ

تحتوي على 64 حفرة يوجد فيها وسط مجفف ودليل لوني تجري فيه الاختبارات الكيموحيوية

ويسجل الجهاز التغيرات اللونية الحاصلة نتيجة لنمو البكتريا وقد أجريت الاختبارات بعد تنمية

العزلات البكتيرية على وسط أكار الماكونكي بطريقة التخطيط Streaking وحضنت بدرجة حرارة

37م لمدة 24 ساعة بعد ذلك لقت أنابيب خاصة بالتشخيص تدعى أنابيب

Kan Tubes حاوية على 3 مل من المحلول الفسلجي الملحي Normal Saline وذلك بأخذ 3

مستعمرات منفردة لتحضير عالق Suspension ثم قيست كثافته بوساطة جهاز Densichek ،

إذ كانت كثافته تتراوح بين 0.5 – 0.63 وبعد الانتهاء من تحضير العينة يتم ادخالها إلى باب

المألاً ليتم انتقال العينة من أنابيب كان Kan tube إلى داخل العدة التشخيصية Kit بعدها نقل العينات يدوياً إلى باب التحميل ليتم الحضان وتعطى النتيجة بين 4-6 ساعات.

9-2-3 حفظ العزلات البكتيرية Preservation of bacterial isolates

1-9-2-3 الحفظ قصير الأمد Short term storage

زرعت العزلات البكتيرية على وسط الآكار المغذي Nutrient agar في أنابيب بطريقة التخطيط المائل وحضنت بدرجة حرارة 37م° ولمدة 24 ساعة وبعدها حفظت في الثلاجة بدرجة حرارة 4م° لغرض العمل اليومي (Vandepitte *et al.*, 2003).

2-9-2-3 الحفظ طويل الأمد Long term storage

زرعت العزلات البكتيرية باستعمال وسط نقيع القلب والدماغ السائل المشار له في الفقرة (1.4.2.3) ، إذ تم توزيع الوسط بكمية 5 مل في أنابيب زجاجية ثم عقم الوسط باستعمال المؤصدة ثم لقت الأنابيب بالمستعمرات البكتيرية وحضنت عند درجة حرارة 37م° لمدة 24 ساعة وأضيف له الكليسيروول المعقم بتركيز 15% ، بعدها حفظت الأنابيب بدرجة حرارة -20م° لحين الاستعمال (Feltham *et al.*, 1978).

10-2-3 فحص اختبار الحساسية للمضادات الحيوية لبكتريا *K.pneumoniae* باستعمال

التركيز المثبط الأدنى Sensitivity test of *K. pneumoniae* MIC

اجري الاختبار بعد تحضير المزرعة البكتيرية وذلك بزرع العزلات البكتيرية على وسط آكار الماكونكي بطريقة التخطيط وحضنت بدرجة حرارة 37م° لمدة 24 ساعة، بعدها أخذت أنبوتان من كان تيوب Kan tube ووضع فيها 3 مل من المحلول الملحي الفسلجي Normal saline المجهر من قبل الشركة المصنعة BioMerieux ، إذ ملئت الأنابيب بوساطة Dispensette ثم أخذت مستعمرتان منفردة بوساطة لوب بلاستيكي معقم ووضعت في الأنابيب لعمل عالق بكتيري Suspension ثم قيست الكثافة بوساطة جهاز Densicheck™ Plus، إذ تكون كثافته مساوية

إلى 0.50-0.63 ثم نقل حجم ثابت من الأنبوبة الاولى إلى الأنبوبة الثانية الخاصة بفحص الحساسية بواسطة ماصات دقيقة Micropipettes بحجم 145 مايكروليتر خاصة بالبكتريا السالبة لصبغة كرام.

3-2-11 الكشف عن تكون الغشاء الحيوي باستعمال وسط اكار الكونغو الأحمر

زرعت البكتريا على وسط أكار الكونغو الأحمر المشار له في الفقرة (3.2.4.2.3) بطريقة التخطيط ثم حضنت بدرجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة، ظهور المستعمرات باللون الاسود دليل على إيجابية الكشف (Freeman *et al.*, 1989).

3-2-12 اختبار تلازن كريات الدم الحمر حسب ما جاء في (Bosch *et al.*, 1980)

3-2-12-1 تحضير العالق البكتيري

حضر عالق الخلايا البكتيرية لعزلات بكتريا *K. pneumoniae* وذلك بأخذ مستعمرة نامية على وسط اكار الماكونكي بعمر 24 ساعة ولقحت في داريء الفوسفات الملحي المحضر وفق الفقرة (3-2-2-1) .

3-2-12-2 تحضير عالق كريات الدم الحمر للإنسان فصيلة A

حضرت عينة الدم بظروف معقمة بأخذ نسبة حجم 1 مل من الدم إلى 1 مل من محلول السيفير المحضر وفق الفقرة (3-2-2-2) وحفظ في درجة حرارة 4 م لحين الاستعمال ثم نبذ الدم بجهاز الطرد المركزي بسرعة 1500 دورة/ دقيقة لمدة 5 دقائق للحصول على كريات الدم الحمر ثم غسلت الخلايا مرتين بمحلول داريء الفوسفات الملحي المحضر وفق الفقرة (3-2-2-1) وأعيد تعليق الخلايا الحمر بداريء الفوسفات بنسبة (1 : 4) .

3-12-2-3 التحري عن الخمل من النوع الأول والثالث بطريقة تلازن دم الإنسان

مزج في اطباق المعايرة الدقيقة 25 Microtiter plate مايكروليتر من العالق البكتيري مع 60 مايكروليتر من داريء الفوسفات الحاوية على المانوز (دارئ الفوسفات الخالي من المانوز استعمل كمحلول سيطرة) المحضرة وفق الفقرة (3-2-2-3) مع 60 مايكروليتر من الدم المحضر في الفقرة (2-12-2-3)، ثم نقلت على أحد طرفي شريحة زجاجية ، كما مزج على الطرف الثاني من الشريحة محلول السيطرة ولوحظ التلازن خلال دقيقتين.

13-2-3 استخلاص دنا البكتريا الجينومي Genomic DNA Extraction

استعملت العدة المجهزة من قبل شركة Promega لاستخلاص دنا البكتريا وحسب الخطوات

الآتية:

1. لقت أنابيب حاوية على وسط نقيع القلب والدماغ السائل المعقم بالمستعمرات البكتيرية وحضنت بدرجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة.
2. نقل 1.4 مل من المزرعة البكتيرية السائل بوساطة ماصة دقيقة إلى أنابيب ايندورف معقمة Eppendorf Tubes سعة 1.5 مل.
3. نبذت أنابيب ايندورف بجهاز الطرد المركزي Centrifuge بسرعة 13000 دورة/ دقيقة ولمدة 3 دقائق، بعد انتهاء الطرد المركزي تم التخلص من السائل العلوي Supernatant بوساطة الماصة الدقيقة وحفظ الراسب .
4. أضيف 500 مايكروليتر من محلول تحليل الأنوية Nuclei lysis solution إلى أنابيب ايندورف الحاوية على الراسب ومزج الراسب جيداً بوساطة المازج Vortex بعدها نقلت الأنابيب إلى حمام مائي Water bath عند درجة حرارة 70م ولمدة 30 دقيقة ثم تركت لتبرد بدرجة حرارة الغرفة.

5. أضيف 3 مايكروليتر من محلول RNase A solution إلى أنابيب أبندورف ومزجت جيداً ثم حضنت بدرجة حرارة 37م لمدة 15 دقيقة، بعدها بردت الأنابيب إلى درجة حرارة الغرفة.
6. أضيف 200 مايكروليتر من محلول ترسيب البروتين Protein Precipitation Solution إلى أنابيب ابندورف، ثم مزجت جيداً بواسطة المازج Vortex ثم وضعت الأنابيب في الثلاجة لمدة 10 دقائق.
7. نبذت الأنابيب بجهاز الطرد المركزي بسرعة 13000 دورة/ دقيقة لمدة 5 دقائق.
8. نقل الطافي إلى أنابيب ابندورف جديدة معقمة وأضيف إليه 500 مايكروليتر من كحول Isopropanol المبرد ومزج جيداً باستعمال الماصة وبعد ذلك وضعت الانابيب في الثلاجة لمدة 10 دقائق.
9. نبذت أنابيب ابندورف بواسطة جهاز الطرد المركزي بسرعة 13000 دورة/ دقيقة لمدة 10 دقائق، ثم سكب الطافي واحتفظ بالراسب الذي يمثل الدنا.
10. أضيف 500 مايكروليتر من كحول الايثانول بتركيز 70% إلى أنابيب أبندورف ومزجت جيداً وبعدها نبذت مركزياً بسرعة 13000 دورة/ دقيقة لمدة 5 دقائق.
11. أزيل الايثانول من الأنابيب وترك الراسب ليجف عند درجة حرارة 37م لضمان تبخر الايثانول بالكامل.
12. بعد انتهاء التبخير أضيف 100 مايكروليتر من محلول الإماهة DNA rehydrate solution لكل انبوب ووضع بعدها في الثلاجة بدرجة حرارة 4 م لمدة 24 ساعة لحين الاستعمال.
13. رحل ناتج استخلاص الدنا DNA على هلام الاكاروز بتركيز 1% وبفرق جهد 100 فولت ولمدة 90 دقيقة.

3-2-14 الكشف الجزيئي عن جينات *mrk D*, *mrk A*, *fim H*, *fim A* باستعمال تفاعلالبلمرة المتسلسل PCR لبكتريا *K.pneumoniae*

يوضح الجدول (3-8) الحجم الكلي لمزيج تفاعل البلمرة المتسلسل، وبعد تحضير مزيج

التفاعل ضبطت الظروف المثالية لتفاعل البلمرة المتسلسل، إذ ضخمت مناطق من الدنا DNA

للعزلات البكتيرية بواسطة جهاز التدوير الحراري Thermal Cycler. ضبطت الظروف المثلى

لتنفيذ تفاعل PCR للجينات كما مبين في الجدول (3-9).

جدول (3-8) محتويات مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل.

الحجم بالميكروليتر	محتويات مزيج التفاعل	الرقم
1	البادئ الأمامي للجين	1
1	البادئ العكسي للجين	2
2	DNA template (دنا العينة)	3
6	Deionized Nuclease – free Water	4
10	Go Taq® Green Master Mix 2X	5
20	الحجم الكلي	

جدول (3-9) الظروف المثلى لتضخيم جزء من الجينات *mrk D*, *mrk A*, *fim H*, *fim A*

عدد الدورات	الوقت	درجة الحرارة المثوية	المرحلة	التسلسل
دورة واحدة	5 دقائق	95	مرحلة المسخ الأولى Initial DNA denaturation	1
35 دورة	30 ثانية	95	مسخ DNA DNA denaturation	2
	30 ثانية	62	الالتحام Annealing	3
	45 ثانية	72	الاستطالة Extension	4
دورة واحدة	7 دقائق	72	مرحلة الاستطالة النهائية Final Extension	5

3-2-15 الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز Agarose gel electrophoresis

1. حضر هلام الاكاروز Agarose gel بإذابة 1.5 غم من الأكاروز Agarose في 100

مل من محلول دارى الترحيل 1x TBE المحضر وفقاً للفقرة (3-2-2-5) وبعدها تم

تسخين الاكاروز لدرجة الغليان وترك ليبرد إلى درجة حرارة 50م ثم أضيف 1 مل من

بروميد الايثيديوم Ethidium Bromide.

2. صب الاكاروز في صفيحة الاسناد بعد تثبيت المشط بهدوء داخل الصفيحة بعدها ترك

ليتصلب لمدة 30 دقيقة.

3. رفع المشط من صفيحة الاكاروز المتصلب بهدوء ثم ثبتت الصفيحة داخل وحدة الترحيل

الكهربائي المتمثلة بالحوض المستعمل في الترحيل الكهربائي بعدها تم ملء حوض

الترحيل بدارى 1x TBE بكمية تغطي سطح هلام الاكاروز بالكامل.

4. نقل 5 مايكروليتر من ناتج تفاعل البلمرة PCR إلى الحفرة المخصصة لها ونقل أيضاً 2.5 مايكروليتر من محلول الدليل الحجمي DNA Ladder (1500-100) زوج قاعدة المستعمل لتحديد أحجام قطع الدنا DNA ثم مرر تيار كهربائي بفرق جهد 100 فولت ولمدة 90 دقيقة.
5. فحص هلام الاكاروز باستعمال مصدر أشعة فوق البنفسجية UV-Transilluminator.

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

4. النتائج والمناقشة Results and Discussion

1-4 جمع وزرع العينات Collection and Culturing of Samples

جمعت 64 عينة سريرية من مستشفى حماية الاطفال بمدينة الطب ببغداد لأطفال مصابين بالتهاب الامعاء التخري تضمنت 41 عينة من الخروج Stool، 14 عينة من الدم Blood و9 عينات من البول Urine للمدة من 2018/1/29 الى 2018/4/4 . زرعت جميع العينات على وسط أكار الماكونكي MacConkey agar ووسط اكار الدم Blood agar لغرض تشخيصها وأدامتها.

2-4 عزل وتشخيص العزلات البكتيرية

Isolation and Identification of Bacterial Isolates

أظهرت جميع العزلات البكتيرية التي نمت على وسط اكار الدم بشكل مستعمرات بيضاء وبنية اللون بينما أظهرت العزلات البكتيرية التي تم تنميتها على وسط اكار الماكونكي بشكل مستعمرات وردية مما يدل على انها مخمرة لسكر اللاكتوز وظهرت عزلات اخرى مستعمرات شاحبة اللون مما يدل على انها غير مخمرة لسكر اللاكتوز.

1-2-4 التشخيص المجهرى Microscopic Identification

أظهر الفحص المجهرى للعزلات البكتيرية بعد تصبيغها بصبغة كرام غالباً ما كانت عصيات سالبة لصبغة كرام والبعض منها كانت موجبة لصبغة كرام.

2-2-4 الاختبارات الكيموحيوية Biochemical tests

أظهرت نتائج الاختبارات الكيموحيوية كما هو مبين في الملحق (1) لجميع العزلات البكتيرية ان البكتيريا السائدة كانت *K. pneumoniae*، اذ اعطت نتيجة سالبة لاختبار الاوكسيداز Oxidase والاندول Indol واحمر المثل Red methyl وموجبة لاختبار الكتاليز

Catalase والفوكس بروسكاور والسترات Citrate واليوريز Urease ومخمرة لسكر الكلوكوز وغير منتجة لغاز H_2S على وسط Kligler Iron Agar.

فيما اعطت بكتيريا *E. coli* نتيجة سالبة للاوكسديز والفوكس بروسكاور والسترات واليوريز وموجبة للكتاليز والاندول واحمر المثل Red methyl وغير منتجة لغاز H_2S .

اما بكتيريا *P. aeruginosa* فقد اظهرت نتيجة سالبة للاندول والفوكس بروسكاور Voges-proskauer وموجبة للاوكسديز والكتاليز والسترات ومتغايرة لاحمر المثل و غير منتجة لغاز H_2S ومتغايرة لفحص اليوريز، في حين اعطت بكتيريا *K. oxytoca* نتيجة موجبة لاختبار الكتاليز والاندول والسترات والفوكس بروسكاور واليوريز وسالبة للاوكسديز واحمر المثل ومخمرة لسكر الكلوكوز وغير منتجة لغاز H_2S على وسط KIA، أما بكتيريا *E. cloacae* فقد أظهرت نتيجة موجبة للكتاليز والسترات والفوكس بروسكاور ومتغايرة لفحص اليوريز ونتيجة سالبة للاوكسديز والاندول واحمر المثل و مخمرة لسكر الكلوكوز وغير منتجة لغاز H_2S على وسط KIA، وظهرت بكتيريا *P. hauseri* نتيجة سالبة لاختبار الاوكسديز والسترات والفوكس بروسكاور، وموجبة للكتاليز والاندول واحمر المثل واليوريز، ومخمرة لسكر الكلوكوز ومنتجة لغاز H_2S على وسط KIA .

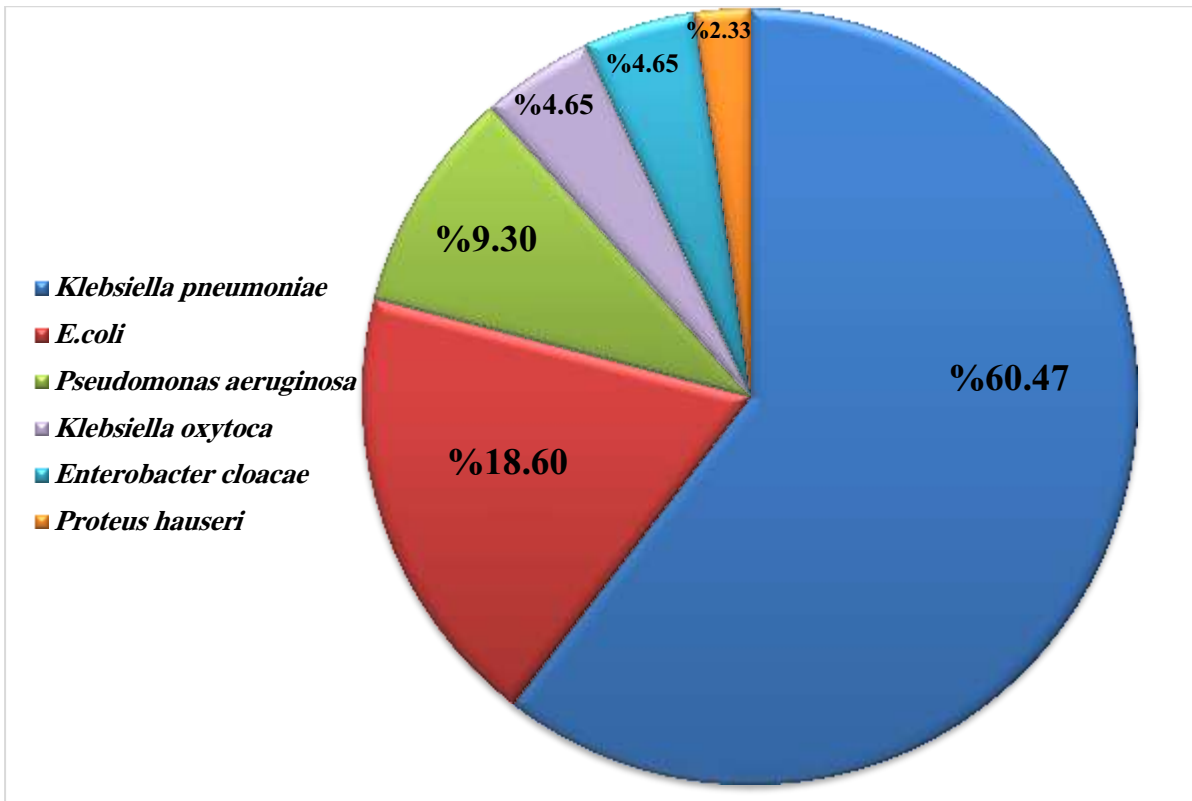
3-2-4 التشخيص بجهاز الفايتهك Vitek-2 Compact System GN-Card

استعمل نظام Vitek-2 لغرض تشخيص العزلات البكتيرية، اذ يوفر هذا الجهاز 64 اختباراً من الاختبارات الكيموحيوية اللازمة لتشخيص العزلات البكتيرية كما مبين في الملحق (2). بعد ان حددت الصفات المزرعية للمستعمرات والصفات المجهرية للخلايا البكتيرية، ومن ثم شخصت باستعمال الاختبارات الكيموحيوية وتأكيدها تشخيصها بواسطة نظام الفايتهك، إذ تم تشخيص 43 عزلة بكتيرية سالبة لصبغة كرام من اصل 64 عينة خروج دم وبول لأطفال رضع والمتبقي كان قسم منها موجبة لصبغة كرام وقسم اخر لم يظهر نمو على وسط اكار الدم ووسط

أكار الماكونكي، ومن خلال التشخيص بنظام الفايتهك اظهر ان عدد عزلات بكتيريا *K.pneumoniae* كانت 26 عزلة بنسبة 60.47% و 8 عزلات *E.coli* بنسبة 18.60%، و 4 عزلات *P. aeruginosa* بنسبة 9.30% وعزلتين *K.oxytoca* بنسبة 4.65% وعزلتين *E. cloacae* بنسبة 4.65% وعزلة واحدة لبكتيريا *P. hauseri* بنسبة 2.33% كما مبين في الشكل (1-4).

أظهرت النتائج إن بكتيريا *K. pneumoniae* هي النوع السائد في العينات المأخوذة من الاطفال الرضع المصابين بالالتهاب المعوي القولوني الناخر، وكانت عدد عزلات بكتيريا *K.pneumoniae* المعزولة من عينات الخروج 23 عزلة بنسبة 88.46% وعزلتين بنسبة 7.69% من الدم وعزلة واحدة من البول بنسبة 3.84%.

أشارت دراسة (Grishin et al. (2013) إن بكتريا *K.pneumoniae* سجلت أعلى نسبة إصابة لمرض الالتهاب المعوي القولوني الناخر عند الأطفال الرضع ، أما الأنواع البكتيرية الأخرى المسببة بنسبة أقل الالتهاب المعوي القولوني الناخر فكانت بكتريا *P.aeruginosa*، *Acinetobacter* وبكتريا *Cronobacter sakazakii*، في حين أشار Warner et al. (2016) أن أجناس البكتريا العصوية السالبة لصبغة كرام تسبب الالتهاب المعوي القولوني الناخر بنسب متفاوتة كما في بكتريا *Klebsiella* ، *E.coli* و *Enterobacter*. فيما أشارت دراسة (Raveh – Sadka et al. (2015) بأن بكتريا *K.oxytoca* تسبب الالتهاب المعوي القولوني الناخر عند الأطفال الرضع بنسب مختلفة.



شكل (1-4): النسب المئوية للعزلات البكتيرية المسببة لالتهاب المعوي القولوني الناخر عند الأطفال الرضع.

3.4 مقاومة بكتيريا *K. pneumoniae* للمضادات الحيوية

أظهرت نتائج اختبار الحساسية للمضادات الحيوية باستعمال نظام Vitek-2 المستعمل لقياس حساسية العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية التي استعملت في الدراسة احتواء الكارت التشخيصي AST-GN75 على 18 مضاداً حيوياً، وقيست حساسية العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية باستعمال Minimum Inhibitory concentration (MIC) الذي يقيس ادنى تركيز مثبط للمضاد وتأثيره في البكتيريا، إذ كانت اغلب العزلات مقاومة لثمانية مضادات فاكثر وهذا دليل على انها ذات مقاومة متعددة Multidrug resistance للمضادات، كما أظهرت بعض العزلات مقاومة عالية، كما في الجدول (1-4) .

جدول (1-4) مقاومة بكتريا *K. pneumoniae* للمضادات الحيوية

المضاد	عزلات بكتيريا <i>K.pneumoniae</i>								
	الحساسية			المتوسطة			المقاومة		
	MIC	العدد	النسبة %	MIC	العدد	النسبة %	MIC	العدد	النسبة %
Amoxicillin	-	-	-	-	-	-	≥ 32	26	100
Ampicillin	-	-	-	-	-	-	≥ 32	26	100
Ampicillin /Subactam	4 (1) 8 (1)	2	7.69	16	5	19.23	≥32	19	73
Piperacillin	8	1	3.85	-	-	-	≥128 (24) 16 (1)	25	96.15
Cefazolin	≤4	3	11.5 4	-	-	-	≥64	23	88.46
Cefoxitin	≤4	10	38.4 6	-	-	-	≥64 (14) ≤4 (2)	16	61.54
Ceftazidime	≤1	3	11.5 4	-	-	-	≥64 (16) 16 (5) 8 (2)	23	88.46
Ceftriaxone	≤1	3	11.5 4	-	-	-	≥64 (23)	23	88.46
Cefepime	≤1	3	11.5 4	-	-	-	≥ 64 (13) 32 (3) 8 (1) 4 (2) 2 (4)	23	88.46
Ertapenem	≤0.5	16	61.5 4	-	-	-	≥ 8	10	38.46
Meropenem	≤0.25	10	38.4 6	2	1	3.84	≥16 (14) 8 (1)	15	57.7
Amikacin	8(1) ≤ 2 (12)	13	50	-	-	-	≥ 64	13	50
Gentamicin	4(2) ≤ 1(11)	13	50	-	-	-	≥64	13	50
Tobramycin	≤1	11	42.3 0	-	-	-	≥64	15	57.70
Ciprofloxacin	1 (3) 0.5 (1) ≤0.25 (10)	14	53.8 4	2 (1) 0.5 (1)	2	7.69	≥4	10	38.46
Levofloxacin	1 (9) 0.5 (1) ≤ 0.12 (5)	15	57.6 9	4	5	19.23	≥8	6	23.07
Nitrofurantoin	32 (3) ≤16 (5)	8	30.7 6	64(14)	14	53.84	128	4	15.38
Trimethoprim/Sul famethoxazole	≤20 (2) 40 (1)	3	11.5 4	-	-	-	≥320	23	88.46

*التركيز يعبر عنه بوحدات مايكروغرام / مل

إذ لوحظ من النتائج انعدام حساسية بكتريا *K.pneumoniae* اتجاه مجموعة البنسلينات ،

اذ لم تسجل أية عزلة حساسية اتجاه المضاد الحيوي Amoxicillin و Ampicillin لتصل نسبة

المقاومة 100% وبتركيز اكبر او يساوي 32 مايكروغرام/مل لكلا المضادين. وهذا يعود لامتلاكها انزيمات البييتالاكتاميز (Marsik and Nambiar, 2011)

أما مضادات البييتالاكتام الممزوجة مع مثبطات انزيمات البييتالاكتاميز فقد كانت نسبة الحساسية منخفضة جداً، فقد اظهرت عزلتين من أصل 26 عزلة حساسيتها للمضاد Ampicillin/Sulbactam بنسبة 7.69% وبتركيز يتراوح بين 4-8 مايكروغرام/مل و 19 عزلة اظهرت مقاومتها وبنسبة 73% وبتركيز أكبر أو يساوي 32 مايكروغرام / مل، و 5 عزلات كانت متوسطة المقاومة للمضاد نفسه بنسبة 19.23% وبتركيز 16 مايكروغرام/مل.

اما مضاد Piperacillin فأظهرت العزلات مقاومة بشكل كبير له، اذ كانت 25 عزلة من أصل 26 عزلة قد اظهرت مقاومة للمضاد وبنسبة 96.15% وبتركيز اكبر أو يساوي 128 مايكروغرام/مل ل 24 عزلة و 16 مايكروغرام/مل لعزلة واحدة. وظهرت عزلة واحدة حساسيتها للمضاد وبنسبة 3.85% وبتركيز 8 مايكروغرام/مل.

اما مضادات السيفالوسبورينات فقد اظهرت ان 23 عزلة من أصل 26 عزلة أبدت مقاومة اتجاه المضادات الحيوية بنسبة 88.46% لمضاد Cefazolin بتركيز اكبر او يساوي 64 مايكروغرام/مل والمضاد Ceftazidime بتركيز اكبر او يساوي 64 مايكروغرام/مل وتركيز 16، 8 مايكروغرام/مل والمضاد Ceftriaxone بتركيز اكبر او يساوي 64 مايكروغرام/مل والمضاد Cefepime بتركيز اكبر او يساوي 64 مايكروغرام/مل وتركيز 32 ، 8 ، 4 ، 2 مايكروغرام/مل وفي الوقت نفسه كانت العزلات حساسة لتلك المضادات بنسبة 11.54% اذ كان تركيز المضاد Cefazolin اصغر او يساوي 4، بينما تركيز المضاد Ceftazidime و Ceftriaxone و Cefepime اصغر او يساوي 1 مايكروغرام/مل، اما المضاد Cefoxitin فقد اظهرت 16 عزلة من اصل 26 عزلة مقاومتها للمضاد بنسبة 61.54% بتركيز اكبر او يساوي 64 وتركيز اصغر او يساوي 4 مايكروغرام/مل، اما العزلات الاخرى فكانت حساسة للمضاد Cefoxitin بنسبة

38.46% بتركيز اصغر او يساوي 4 مايكروغرام/مل. ان مقاومة العزلات البكتيرية للسيفالوسبورينات يعود إلى امتلاك بكتيريا *K. pneumoniae* انزيمات بيتالاکتاميز واسعة الطيف Extended spectrum beta-lactamase (ESBLs) التي لها القدرة على تحلل السيفالوسبورينات التي تعد مشكلة كبيرة لمرضى المستشفيات (Ghafourian et al., 2015 ; Kothari et al., 2013)، إذ أشار (Kothari et al., 2013) إن حساسية بكتريا *K. pneumoniae* لمضادات السيفالوسبورينات الجيل الثالث تتراوح بين 47-50%، أما (Babakhani et al., 2015) فقد أشار إلى ارتفاع مقاومة بكتريا *K. pneumoniae* لمضادات السيفالوسبورينات ومنها Ceftriaxone لتصل 94.12%. أشار رميض والمنخوري (2015) إلى قلة حساسية بكتريا *K. pneumoniae* لمضادات السيفالوسبورينات الجيل الثالث.

أما مجموعة الكاربابينيمات لاسيما مضاد Ertapenem فقد اظهر فعالية اعلى من جميع مضادات البيتالاکتام اتجاه بكتيريا *K. pneumoniae* كونه من المضادات الحديثة نسبياً ، فضلا عن عدم تثبيطه ببعض انزيمات البيتالاکتاميز واسعة الطيف β - Extended Spectrum lactamase اذ كانت 16 عزلة حساسة للمضاد الحيوي Ertapenem وبنسبة 61.54% بتركيز اصغر او يساوي 0.5 مايكروغرام/مل، و 10 عزلات أظهرت مقاومة للمضاد نفسه بنسبة 38.46% وبتركيز اكبر او يساوي 8 مايكروغرام/مل ، فيما أبدى المضاد الحيوي Meropenem حساسية اقل اتجاه العزلات بنسبة 38.46% بتركيز اصغر او يساوي 0.25 مايكروغرام/مل لـ 10 عزلات، وابدت 15 عزلة مقاومة بنسبة 57.7% بتركيز اكبر او يساوي 16 وتركيز 8 مايكروغرام/مل للمضاد نفسه

اشار (Marsik and Nambiar 2011) الى ان اهم اليات المقاومة لمضادات

الكاربابينيمات هي انتاج انزيمات كاربابينيمز الكليبسيلا الرئوية *Klebsiella pneumoniae*

carbapenemase (Kpc) والتي يشفر لها بشكل رئيس من قبل جين محمول على البلازميد، وتوجد انزيمات الكاربابينيميز في العائلة المعوية Enterobacteriaceae و *Pseudomonas spp.* و *Acinetobacter spp.* وهي مثبطة لمعظم مثبطات مضادات البييتالاكتام مثل Clavulanic acid.

إن العزلات المنتجة لـ Kpc تكون مقاومة للكينولينات والامينوكلايكوسايدات لكنها عادة تكون حساسة للمضاد Colistin و Tigecycline، وقد اكتشف أيضا في عام (2009) نوعاً من انزيمات البييتالاكتام المعدنية في عزلات *K. pneumoniae* يدعى انزيم NewDelhi (NDM-1) وهو انزيم واسع الانتشار في العائلة المعوية والبكتريا السالبة لصبغة كرام، ويمثل دوراً مهماً في مقاومة بعض سلالات *K. pneumoniae* للمضادات التابعة لمجموعة الكاربابينيم و مضادات البييتالاكتام الاخرى ما عدا Colistin ، Fosfomycin و Tigecycline .

كما تباينت نسبة الحساسية بين المضادات التي تعود لمجموعة الامينوكلايكوسايد، اذ اظهر مضاد Gentamicin و Amikacin فعالية جيدة ضد 13 عزلة لكل من المضادين وبنسبة مقاومة 50% بتركيز 4 مايكروغرام/مل لعزلتين وبتركيز أصغر او يساوي 1 مايكروغرام/مل لـ 11 عزلة للمضاد Gentamicin وتركيز 8 مايكروغرام/مل لعزلة واحدة وتركيز أصغر او يساوي 2 مايكروغرام/مل لـ 12 عزلة للمضاد الحيوي Amikacin، اما المضاد الحيوي Tobramycin فقد بلغت عدد العزلات الحساسة له 11 عزلة وبنسبة 42.30% بتركيز اصغر او يساوي 1 مايكروغرام/مل.

فيما اظهرت العزلات البكتيرية في الوقت نفسه مقاومتها للمضاد Gentamicin و Amikacin في 13 عزلة بنسبة 50% وبتركيز اكبر او يساوي 64 مايكروغرام/مل لكل منهما، في حين اظهرت العزلات البكتيرية مقاومتها للمضاد Tobramycin في 15 عزلة وبنسبة 57.70% وبتركيز اكبر او يساوي 64 مايكروغرام/مل .

أظهرت دراسة (Gad et al., 2011) ان مقاومة عزلات بكتيريا *K. pneumoniae* للمضاد الحيوي Tobramycin قد بلغت نسبة 50% وللمضاد الحيوي Amikacin 25%، وللمضاد الحيوي Gentamicin 50%.

وأشارت دراسة (Navon-Venezia et al., 2017) الى ان مقاومة بكتيريا *K.pneumoniae* للمضادات الحيوية لاسيما مجموعة مضادات الامينوكلايكوسيدات تعود إلى أن الانزيمات البكتيرية التي يشفر لها الجين *armA* تعمل على منع ارتباط مضادات الامينوكلايكوسيدية بالحامض النووي الرايبوسومي 16S rRNA، وتكون هذه الجينات محمولة على بلازميد في بكتيريا *K. pneumoniae* بينما تمتلك الانزيمات المحورة للمضاد طيفاً ضيقاً في فعالية انزيمات 16S rRNA methylase التي تمنح البكتريا مقاومة لجميع مضادات الامينوكلايكوسيدية (Yu et al., 2009)

ان من الآليات المقاومة الكروموسومية اتجاه المضادات الامينوكلايكوسيدية في بكتيريا *K.pneumoniae* تتضمن التحويلات في نفاذية اغشية الخلية التي تؤدي الى التغيرات في انظمة مضخات الدفع لاسيما KPnEF و AcrAB-Tolc وكذلك بسبب فقدان البورينات (Navon-Venezia et al., 2017).

يزيد انتشار AcrAB-Tolc المقاومة للمضادات Tobramycin و Gentamicin (Padilla et al., 2010)، بينما تطفير الجين *KpnEF* يظهر تغيراً قوياً في المقاومة للمضادات Tobramycin و Spectinomycin (Srinivasan and Rajamohan, 2013).

أما مجموعة الكينولونات Quinolones وبالتحديد الكينولونات المفلورة، فقد اظهر المضاد الحيوي Ciprofloxacin فعالية ضد 14 عزلة وبنسبة حساسية 53.84% من العزلات بتركيز 1 و 0.5 مايكرو غرام / مل واصغر او يساوي 0.25 مايكروغرام/مل، اذ تعد هذه النسبة جيدة وذلك بسبب كثرة الاستعمال لهذا المضاد الحيوي في علاج أغلب الاصابات البكتيرية السريرية ولاسيما

عندما تكون الإصابة قد حصلت او نجمت عن طريق بكتيريا سالبة لصبغة كرام، فيما اظهرت العزلات البكتيرية مقاومتها اتجاه المضاد الحيوي Ciprofloxacin بواقع 10 عزلات وبنسبة 38.46% وبتركيز اكبر او يساوي 4 مايكروغرام/مل، في حين كانت هناك عزلتين متوسطة الحساسية لهذا المضاد وبنسبة 7.69% بتركيز 2 و 0.5 مايكروغرام/مل .

اما المضاد الحيوي Levofloxacin فقد اظهرت 15 عزلة قيد الدراسة حساسيتها لهذا المضاد بنسبة 57.69% وبتركيز 1 و 0.5 مايكروغرام/مل وكذلك بتركيز اصغر او يساوي 0.12 مايكروغرام/مل، كما اظهرت 6 عزلات بكتيرية مقاومتها بنسبة 23.07% بتركيز اكبر او يساوي 8 مايكروغرام/مل، فيما كانت 5 عزلات متوسطة الحساسية للمضاد نفسه بنسبة 19.23% بتركيز 4 مايكروغرام/مل.

إن تطور اليات المقاومة البكتيرية للكينولينات، امتازت بكتيريا *K.pneumoniae* بجمعها لكل اليات المقاومة للكينولينات في البكتيريا السالبة لصبغة كرام، التي تتضمن الطفرات في موقع الهدف الجيني، زيادة انتاج مضخات الدفع للمضادات الحيوية المتعددة، انزيمات محورة وانتاج بروتينات حماية الهدف Target Protection Proteins، وان الالية الرئيسة والاولى في مقاومة *K.pneumoniae* لمضادات الكينولينات هي الطفرات الكروموسومية التي تمنع ارتباط الكينولينات مع انزيم DNA gyrase وانزيم Topoisomerase المهمين في تخليق الدنا. (Navon- DNA Venezia et al., 2017; Redgrave et al., 2014).

وفي الوقت الحاضر اكتشفت الية مقاومة الكينولينات في بكتيريا *K. pneumoniae* وهي جينات *qnr* المحمولة على البلازميد والتي تشفر لبروتينات لحماية انزيم DNA gyrase وانزيم Topoisomerase، فضلاً عن جينات *aac (6)-Ib-cr* المسؤولة عن تحويل الكينولينات وتثبط فعاليتها ضيقة الطيف مثل Ciprofloxacin و Norfloxacin، إن مقاومة الامينوكلايكوسايد غالباً مرافقة لمضادات بيتالاکتام والكينولينات المفلورة.

إن جينات *aac(6)-Ib-cr* تمنح المقاومة لكل من الامينوكلايكوسايد مثل Kanamycin، Norfloxacin و Ciprofloxacin والكينولينات المفلورة مثل Tobramycin و Amikacin (Navon-Venezia *et al.*, 2017 Schultsz and ;Geerlings, 2012; Ruiz *et al.*, 2012).

اظهرت النتائج ان هناك 4 عزلات مقاومة للمضاد الحيوي Nitrofurantoin وبنسبة 15.38% بتركيز 128 مايكروغرام/مل و 14 عزلة متوسطة الحساسية للمضاد Nitrofurantoin بنسبة 53.84% بتركيز 64 مايكروغرام/مل، فيما كانت هناك 8 عزلات حساسة لهذا المضاد بنسبة 30.76% بتركيز 32 مايكروغرام/مل وتركيز اصغر او يساوي 16 مايكروغرام/مل.

وقد بينت دراسة (Osei Sekyere(2018 ان مقاومة Nitrofurantoin غير شائعة، وهو مضاد مهم للبكتيريا المسببة لالتهابات المسالك البولية والمقاومة للمضادات مثل السيفالوسبورينات، الكينولينات المفلورة، الامينوكلايكوسايدية والكاربابينيمات، ويعود ذلك إلى قدرته على احداث اضرار للدنا وتثبيط انتاج البروتينات من خلال التفاعل مع كل البروتينات الريبوسومية و rRNA.

اما مجموعة المضادات الحيوية المثبطة لمسار الفوليت فقد اظهرت 23 عزلة قيد الدراسة مقاومتها للمضاد الحيوي Trimethoprim/Sulfamethoxazole بنسبة 88.46% بتركيز اكبر او يساوي 320 مايكروغرام/مل، فيما بينت 3 عزلات حساسيتها للمضاد نفسه بنسبة 11.54% بتركيز اصغر او يساوي 20 مايكروغرام/مل و بتركيز 40 مايكروغرام/مل. تعود مقاومة بكتيريا *K.pneumoniae* للمضاد الحيوي Trimethoprim/Sulfamethoxazole من خلال تغير نفاذية جدار الخلية، استبدال المسارات الايضية، امتلاكها الانزيم الكروموسومي والبلازميدي المقاوم Dihydrofolate reductase و انتاجه بكميات كبيرة (Huovinen, 1995; 1987).

4-4 الانماط المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية لبكتريا *K.pneumoniae*

اظهرت الدراسة الحالية ان اغلب عزلات بكتريا *K.pneumoniae* قد اظهرت مقاومة متعددة للمضادات الحيوية والجدول (2-4) يوضح انماط مقاومة عزلات بكتريا *K.pneumoniae* للمضادات الحيوية، إذ أعطت البكتريا اعلى نمط مقاومة مضاد حيوي وكان 17 مضاداً حيوياً وبنسبة 15.38%. في حين اعطت مقاومة متعددة للأنماط التي بلغت 16 و 15 و 14 و 13 و 11 مضاداً حيوياً بنسبة 7.69%, 11.53%, 7.69%, 11.53%, 3.84% , على التوالي، اما الانماط الاخرى 9 ، 8 ، 7 ، 6 و 4 مضاداً حيوياً فكانت بنسبة 7.69%, 19.23%, 3.84%, 3.84%, 3.84%، على التوالي، نلاحظ إن أكثر العزلات البكتيرية ذات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية من النمط الأول والثامن والتي أظهرت بكتريا *K.pneumoniae* مقاومتها الى 17 و 8 مضاد حيوي، أما بقية الانماط تراوحت بين (1-3) عزلة بكتيرية.

جدول (2-4) أنماط المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية لعزلات بكتريا *K.pneumoniae*

النمط	عدد المضادات الحيوية	عدد العزلات	النسبة المئوية %	المضادات الحيوية
R1	17	4	15.38	AMX , AMP , SAM , CFZ , PIP , FOX , CAZ , CRO , FEP , ETP , MEM , AK , GM , TM , CIP , LVX , SXT , NIT
R2	16	2	7.69	AMX , AMP , SAM , CFZ , PIP , FOX , CAZ , CRO , FEP , ETP , MEM , AK , GM , TM , CIP , SXT , NIT
R3	15	3	11.53	AMX , AMP , SAM , CFZ , PIP , FOX , CAZ , CRO , FEP , MEM , AK , GM , TM , CIP , SXT , LVX
R4	14	2	7.69	AMP , SAM , CFZ , PIP , FOX , CAZ , CRO , FEP , MEM , AK , TM , LVX , CIP , SXT , GM
R5	13	3	11.53	AMX , SAM , PIP , FOX , CAZ , CRO , FEP , MEM , GM , TM , NIT , SXT , AK
R6	11	1	3.84	AMP , SAM , PIP , CFZ , FOX , CAZ , CRO , FEP , MEM , LVX , SXT
R7	9	2	7.69	AMX , AMP , PIP , CFZ , CAZ , CRO , FEP , SXT , SAM , FOX
R8	8	5	19.23	AMX , AMP , PIP , CFZ , CAZ , CRO , FEP , SXT , SAM ,
9	7	1	3.84	AMP , PIP , CFZ , CAZ , CRO , FEP , SXT
10	6	1	3.84	AMP , SAM , PIP , CFZ , CRO , SXT
11	4	1	3.84	AMP , PIP , GM , TM

AMX: Amoxicillin, AMP: Ampicillin, SAM: Ampicillin/Sulbactam, PIP: Piperacillin, CFZ: Cefazolin, Fox: Cefoxitin, CAZ: Ceftazidime, CRO: Ceftriaxone, FEP: Cefepime, ETP: Ertapenem, MEM: Meropenem, AK: Amikacin, GM: Gentamicin, TM Tobramycin, CIP: Ciprofloxacin, LVX: Levofloxacin, NIT: Nitrofurantoin, SXT: Trimethoprim/Sulfamethoxazole.

تبين النتائج أن بكتريا *K.pneumoniae* كانت ذات مقاومة متعددة للمضادات الحيوية

وهذا يعود إلى امتلاكها انزيمات البييتالاكتاميز وأنزيمات البييتالاكتاميز واسعة الطيف، وأنزيمات

كاربابينيمز الكليبيسيلا الرئوية (Kpc) *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase

ومضخات الدفع Efflux pump، فضلاً عن أحداثها التحويرات في نفاذية غشاء الخلية الطفرات

في موقع الهدف الجيني والطفرات الكروموسومية (Navon-Venezia et al., 2017).

5-4 الكشف عن قابلية بكتريا *K.pneumoniae* على الالتصاق بوساطة T1f و

T3f

كشفت عن قابلية جميع عزلات بكتريا *K.pneumoniae* على الالتصاق من خلال الخمل من النوع الاول T1f والخمل من النوع الثالث T3f على اساس حساسيتها أو مقاومتها لسكر المانوز. اوضحت نتائج فحص تلازن كريات الدم الحمر للعزلات البكتيرية المدروسة كما في الجدول (3-4) أن عدد 26/16 بنسبة (61.54%) من العزلات تمتلك الخمل من النوع الاول T1f اي حساسة لسكر المانوز إذ انها لم تحدث تلازناً على سطح الشريحة الزجاجية، في حين كان عدد 26/10 بنسبة (38.46 %) من العزلات تمتلك الخمل من النوع الثالث T3f اي مقاومة لسكر المانوز، اذ انها احدثت تلازناً على سطح الشريحة الزجاجية.

جدول (3-4) مقاومة وحساسية بكتريا *K.pneumoniae* لسكر المانوز باستعمال فحص تلازن كريات الدم الحمر.

Mannose				عدد العزلات
Sensitive حساسة		Resistant مقاومة		26
النسبة المئوية %	العدد	النسبة المئوية %	العدد	
61.54	16	38.46	10	

أشار Livrelli *et al.* (1996) إلى امتلاك بكتريا *K.pneumoniae* خمل من النوع الاول وبنسبة 96% ومن النوع الثالث وبنسبة 93%. في حين اشار Alcantar-Curiel (2013) إلى امتلاك بكتريا *K.pneumoniae* الخمل من النوع الاول وبنسبة 96% والنوع الثالث 55%.

اما دراسة Gerlach *et al.* (1989) فقد أشارت إلى ان عدد 20/9 بنسبة (45%) من عزلات بكتريا *K.pneumoniae* تمتلك الخمل من النوع الاول وكانت حساسة لسكر المانوز، وأكدت الدراسة أيضاً ان صفة الحساسية للمانوز يمكن ان تحدث بغياب الخمل من نوع T1f مشيراً

بالوقت نفسه ان بكتريا *K.pneumoniae* المنتجة للخمل من النوع الأول وعدم احداثها للتلازن انها تمتلك صفة الالتصاق، وهذا يعود الى امتلاكها جين *fim A*، وان احداثها للتلازن يكون عند امتلاك بكتريا *K.pneumoniae* اعداداً كبيرة من البلازميدات الحاملة لجين *fim A* والذي يؤدي الى احداث الالتصاق . في حين اشار (Schurtz *et al.* (1994) ان عدد 39/29 بنسبة 74.35% من عزلات بكتريا *K.pneumoniae* التي تمتلك الخمل من النوع الثالث وأظهرت مقاومة لسكر المانوز، وان كل سلالات بكتريا *K.pneumoniae* التي أحدثت التلازن قد تفاعلت مع الامصال المضادة للخمل من النوع الثالث، وأشارت الابحاث ان التلازن بفعل الخمل من النوع الثالث يعود الى جين *mrk A* الذي يشفر الى وحدة الخمل الرئيسية والذي يمتلكه اغلب انواع *Klebsiella*، والى جين *mrk D* الذي يشفر الى خمل الالتصاق والذي يمتلكه سلالات قليلة من *K.pneumoniae*، ان خمل الالتصاق هي التي تعود اليها عملية التلازن المقاوم للمانوز Mannose Resistant *Klebsiella like*(MR/K) التي تحدث بمساعدة بروتينات الخمل (Schurtz *et al.*, 1994; Gerlach *et al.*, 1989).

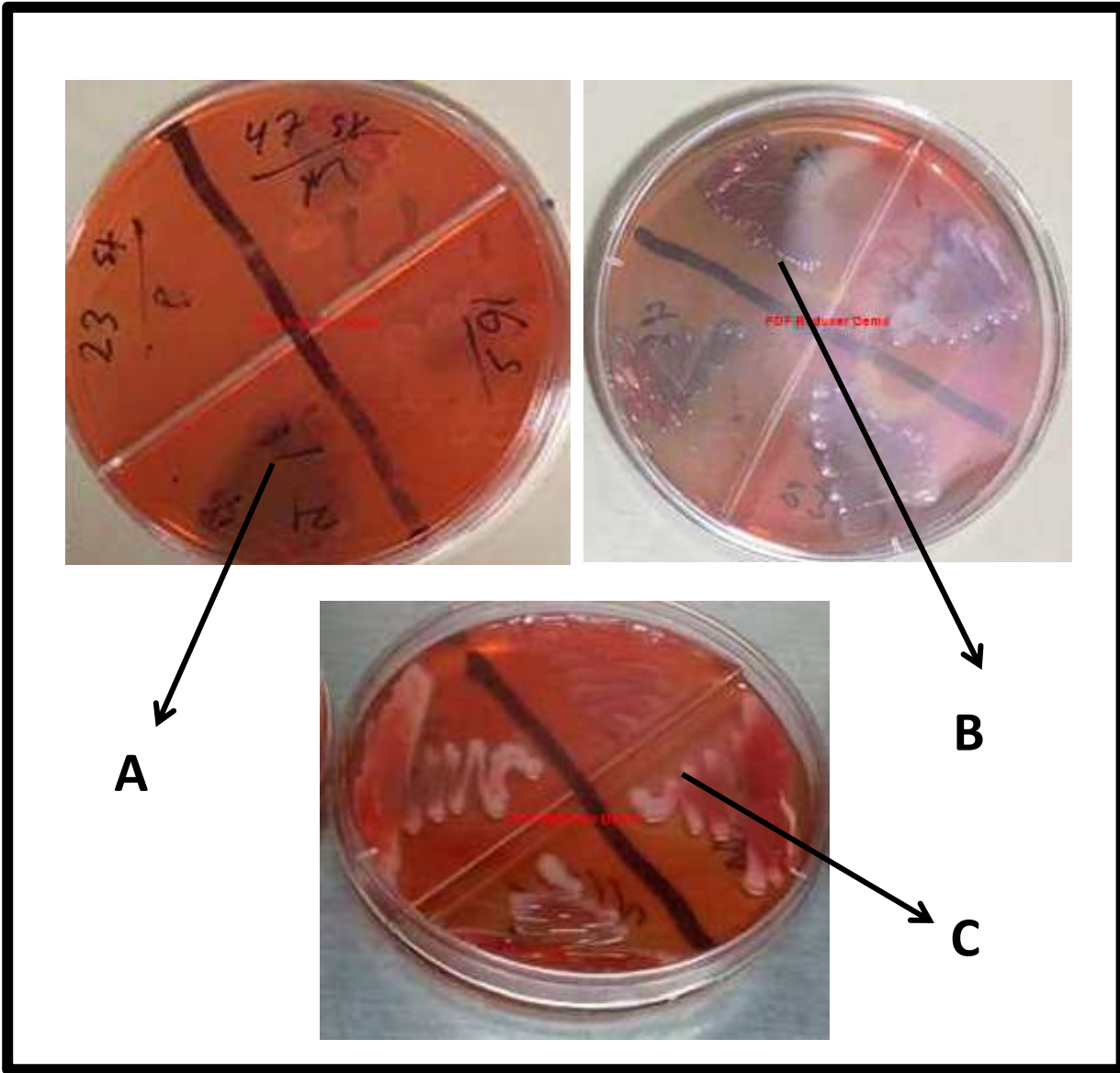
يتضح من النتائج ان اختلاف نسبة امتلاك بكتريا *K.pneumoniae* الخمل من النوع الاول او الثالث يعود الى طبيعة الوسط الزراعي الذي تنمى فيه البكتريا، وهذا ما اشار اليه Hornick *et al.* (1991) ان التلازن بفعل خمل النوع الثالث يعتمد على نوع الوسط الذي تنمى فيه البكتريا اذ يتم التعبير عنها في حالة وجود الكليسرول او الكلوكوز أو الى الطريقة المتبعة لاختبار التلازن.

4-6 قابلية عزلات بكتريا *K.pneumoniae* على تكوين الغشاء الحيوي

اختبرت قابلية جميع عزلات بكتريا *K.pneumoniae* على تكوين الغشاء الحيوي واستعملت طريقة الكونغو الاحمر Congo red لاختبار قدرة البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm اعتماداً على اعطاء مستعمرات ذات لون اسود، ويلاحظ من الجدول (4-4) قابلية بكتريا *K.pneumoniae* على تكوين الغشاء الحيوي، اذ وجد ان عدد 26/14 بنسبة 53.84% من عزلات بكتريا *K.pneumoniae* مكونة للغشاء الحيوي على شكل مستعمرات قوية السواد، في حين كان عدد 26/10 بنسبة 38.46% من العزلات مكونة للغشاء الحيوي بشكل مستعمرات متوسطة السواد، اما العزلات الاخرى فقد كانت بشكل مستعمرات وردية اللون ويعدد 26/2 بنسبة 7.70% غير مكونة للغشاء الحيوي كما في الشكل (4-2).

جدول (4-4) قابلية بكتريا *K.pneumoniae* على تكوين الغشاء الحيوي بطريقة Congo red

النسبة المئوية %	قابلية تكوين الغشاء الحيوي
53.84	قوي
38.46	متوسط
0.00	ضعيف
7.70	غير مكونة



شكل (2-4) قابلية بكتريا *K.pneumoniae* في تكوين الغشاء الحيوي على وسط Congo red agar.

- A : تكوين الغشاء الحيوي على شكل مستعمرات قوية السواد.
- B : تكوين الغشاء الحيوي على شكل مستعمرات متوسطة السواد.
- C : غير مكون الغشاء الحيوي على شكل مستعمرات وردية اللون.

أشار Niveditha *et al.* (2012) الى ان 63% من العزلات البكتيرية التي تعود لبكتريا *K.pneumoniae* اظهرت مستعمرات بلون أسود على وسط اكار الكونغو الأحمر، بينما 37% من العزلات البكتيرية اظهرت مستعمرات حمر على وسط اكار الكونغو اي انها غير مكونة للغشاء الحيوي.

واشار Alwan and Abas (2016) الى ان 72% من العزلات كانت مكونة للغشاء الحيوي و 20% غير مكونة للغشاء الحيوي و 8% غير محددة. في حين اشار Al-Rubiae (2017) الى ان 58% من عزلات بكتريا *K.pneumoniae* أظهرت طبقة مخاطية قوية Strong slime layer التي تؤدي الى تكوين غشاء حيوي قوي يعطي مستعمرات بلون أسود و 36% من العزلات اظهرت تكوين غشاء حيوي متوسط بشكل مستعمرات متوسطة السواد و 6% من العزلات كانت غير مكونة للغشاء الحيوي، اذ كانت بشكل مستعمرات حمر او وردية.

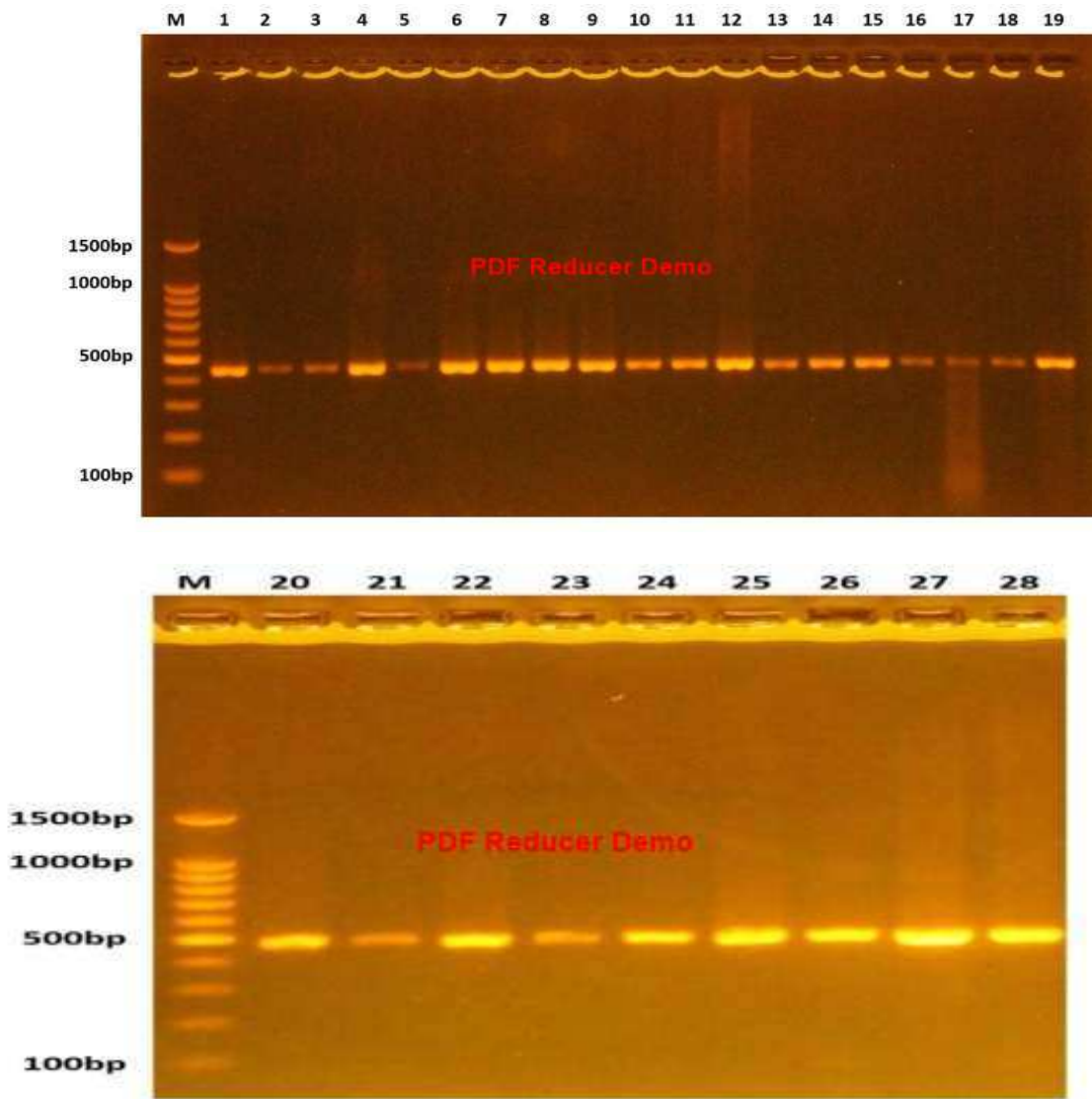
كما أشار Niveditha *et al.* (2012) إن الغشاء الحيوي هو عبارة عن طبقة رقيقة من الكائنات الحية الدقيقة التي تلتصق على سطوح التراكيب العضوية وغير العضوية مع افراز البوليمرات Polymers التي تتحدد حسب قابلية البكتريا على إنتاج طبقة السكريات المتعددة الخارجية فقط التي تعتمد على نوع الوسط، مشيراً إلى أن إفراز البوليمرات الخارجية يكون عاملاً مهماً في مقاومة الخلايا المناعية.

في حين أشار Struve *et al.* (2009) أن حمل النوع الثالث له دور في تكوين الغشاء الحيوي، فضلاً عن دوره في إحداث الإصابة بالمرضى الراقدين بالمستشفيات لا سيما التي تتعلق بقطرة المسالك البولية.

7-4 الكشف الجزيئي عن الجينات Molecular detection of genes

استخلص الدنا الكلي من عزلات بكتريا *K.pneumoniae* السريرية والمأخوذة من عينات الخروج ومن عينات الدم والبول ملحق (3) لأطفال رضع خدج مصابين بالالتهاب المعوي القولوني الناخر باستعمال عدة استخلاص الدنا المجهزة من قبل شركة Promega وبعدها أجري الترحيل الكهربائي له، كشف عن جينات *fim A*, *fim H*, *mrkA*, *mrk D* في العزلات البكتيرية قيد الدراسة وباستعمال طريقة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) Polymerase chain reaction وقد أظهرت النتائج ان عزلات بكتريا *K.pneumoniae* تمتلك بعض هذه الجينات.

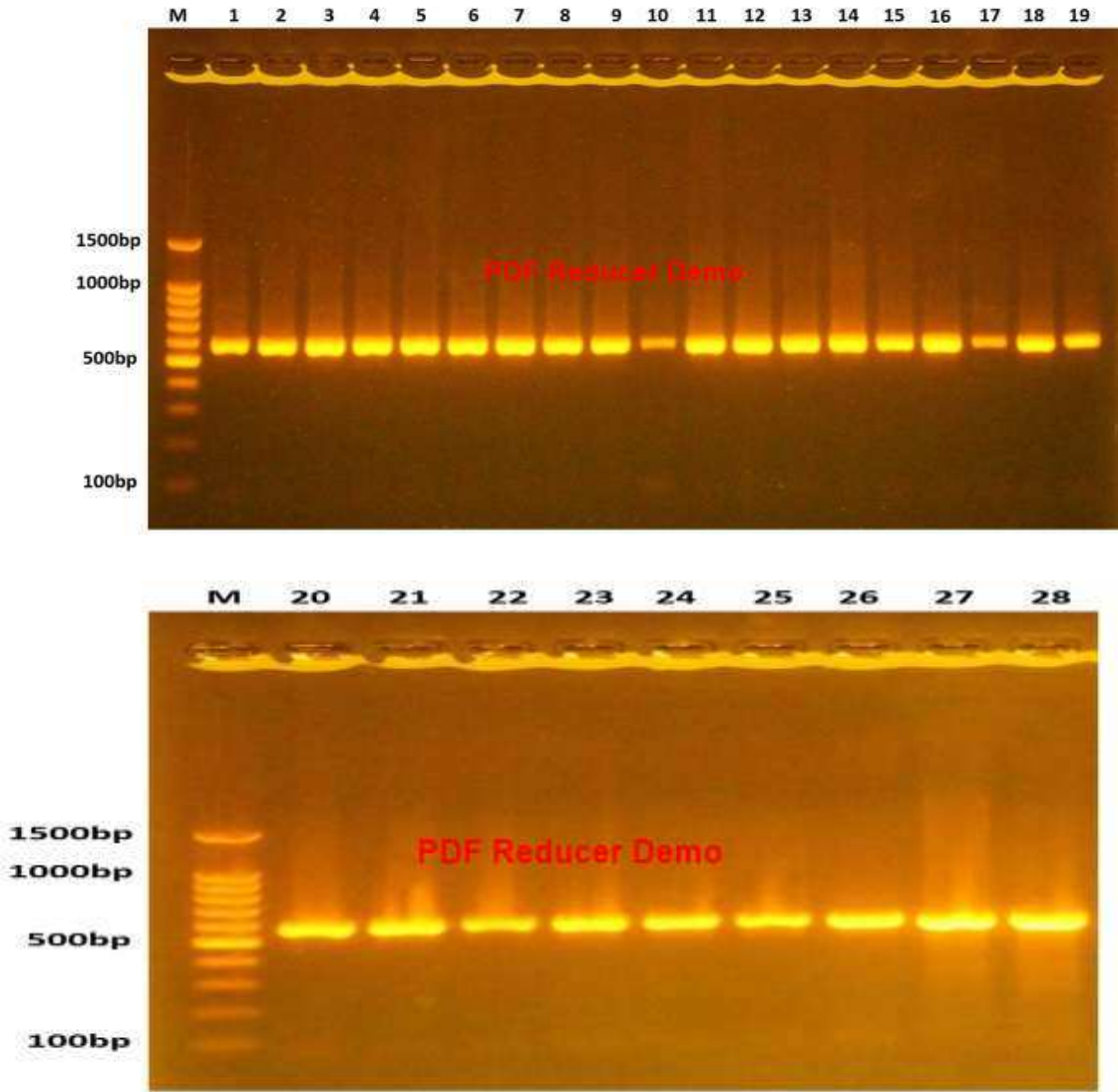
بعد اجراء التفاعل التضاعفي لسلاسل الدنا وباستعمال بوادي Primers خاصة للجينات المدروسة في بكتريا *K.pneumoniae* التي تستهدف التسلسل النوعي للجينات قيد الدراسة لغرض الكشف عن العزلات التي تمتلك هذه الجينات، رحل ناتج التفاعل التضاعفي على هلام الاكاروز Agarose، وبعد فحص هلام الاكاروز تحت الاشعة فوق البنفسجية ظهرت حزمة واحدة بالمستوى نفسه لعزلات بكتريا *K.pneumoniae* التي تمتلك هذه الجينات، وهذا يدل على ارتباط البوادي Primers مع التسلسل المكمل له في شريط الدنا واستعمال الدليل الحجمي 100-1500 زوج قاعدة، إذ أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها في الدراسة الحالية انها متساوية في الوزن الجزيئي للحزم الناتجة عند مقارنتها بالدليل الحجمي. اذ أظهرت النتائج ان 26 عزلة (عينات سريرية أغلبها عينات خروج لأطفال رضع خدج مصابين بالتهاب الامعاء التخري) لبكتريا *K.pneumoniae* تمتلك الجين *fim A* بنسبة 100%، وعند مقارنة حزم الدنا المتضاعفة بالدليل الحجمي وجد ان الحزم الناتجة ذات وزن جزيئي 500 زوج قاعدة كما في الشكل (3-4).



شكل (3-4) الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لعزلات بكتريا *K.pneumoniae* باستعمال بادئ Primer لجزء من الجين *fim A* (500) زوج قاعدة باستعمال هلام الاكاروز بتركيز 1.5% وفرق جهد 100 فولت ولمدة 90 دقيقة. المسار M يمثل الدليل الحجمي 1500-100 زوج قاعدة، (المسارات 1-26) تمثل ناتج تضخم جين *fim A* لعزلات بكتريا *K.pneumoniae* المعزولة من عينات الخروج والدم والبول و*27-28 تمثل بكتريا *K.pneumoniae* عزلات مكررة من الخروج.

أظهرت دراسة (Alcantar-Curiel *et al.* (2013) ان 54 عزلة من اصل 69 عزلة تمتلك الجين *fim A* بنسبة 78% مشيراً في الوقت نفسه الى الانتشار الواسع لاوبيرون *fim* في كل عزلات بكتريا *K.pneumoniae*، وبينت الدراسة التي اجراها (Li *et al.* (2014) و Klemm and Christiansen (1987) ان نواتج جين *fim A* ضرورية لاحداث الالتصاق حتى في حالة غياب وحدات الخمل الرئيسية التي يشفر لها جين *fim H*.

أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان 26 عزلة تعود لبكتريا *K.pneumoniae* تمتلك جين *fim H* بنسبة 100% وعند مقارنة حزم الدنا المتضاعفة بالدليل الحجمي وجد ان الحزم الناتجة ذات وزن جزيئي 576 زوج قاعدة كما في الشكل (4-4).

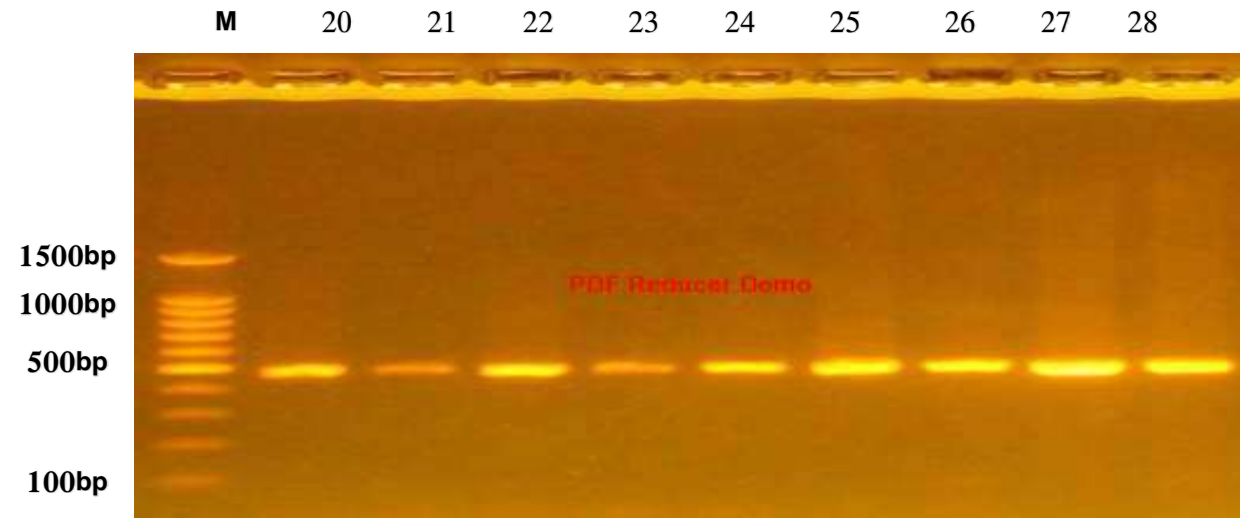
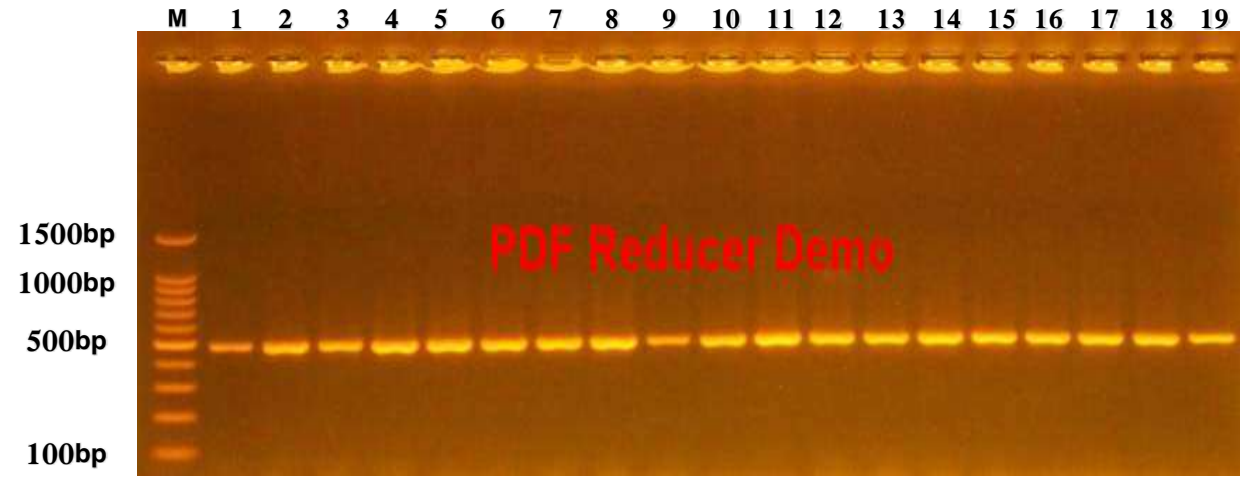


شكل (4-4) الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لعزلات بكتريا *K.pneumoniae* باستعمال بادئ Primer لجين *fim H* (576) زوج قاعدة باستعمال هلام الاكاروز بتركيز 1.5% و فرق جهد 100 فولت لمدة 90 دقيقة. المسار M يمثل الدليل الحجمي 1500-100 زوج قاعدة، المسارات (1-26) تمثل ناتج تضخم جزء من الجين *fim H* لعزلات بكتريا *K.pneumoniae* المعزولة من عينات الخروج والبول و*27-28 تمثل بكتريا *K.pneumoniae* عزلات مكررة من الخروج.

واشارت دراسة (Alcantar–Curiel *et al.* (2013) إن عزلات بكتريا *K.pneumoniae* التي لا تمتلك جين *fim A* قد اظهرت امتلاكها جين *fim H* بنسبة 100%، مشيراً في الوقت نفسه الى ارتفاع تواجد جين *fim H* بين عزلات بكتريا *K.pneumoniae*، في حين اشار (Li *et al.* (2014) أن أوبيرون *fim* الذي يشفر الى الخمل من النوع الاول والتي تعمل على التصاق بكتريا *K.pneumoniae* في انسجة المسالك البولية ولا تساهم تلك الخمل في استعمار بكتريا *K.pneumoniae* أنسجة الامعاء والرئة.

وقد بينت النتائج ان نسب تواجد الجينات *fim A* و *fim H* في بكتريا *K.pneumoniae* المعزولة من مرضى التهاب الامعاء التخري كان أكثر من الدراسات العالمية وهذا قد يعود الى مصدر العزلة.

اظهرت نتائج الدراسة الحالية ان 26 عزلة تعود لبكتريا *K.pneumoniae* تمتلك جين *mrk A* بنسبة 100% وعند مقارنة حزم الدنا المتضاعفة بالدليل الحجمي وجد ان الحزم الناتجة ذات وزن جزيئي 498 زوج قاعدة كما في الشكل (4-5).



شكل (4-5) الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لعزلات بكتريا *K.pneumoniae* باستعمال بادئ Primer لجين *mrk A* 498 زوج قاعدة باستعمال هلام الاكاروز بتركيز 1.5% وفرق جهد 100 فولت لمدة 90 دقيقة.

المسار M يمثل الدليل الحجمي (100-1500) زوج قاعدة، المسارات (1-26) تمثل ناتج تضخم جزء من الجين *mrk A* لعزلات بكتريا *K.pneumoniae* المعزولة من عينات الخروج والدم والبول و* 27-28 تمثل بكتريا *K.pneumoniae* عزلات مكررة من الخروج.

وهذا ما اشارت اليه دراسة Alcantar- Curiel *et al.* (2013) ان كل عزلات بكتريا *K.pneumoniae* تمتلك الجين *mrk A* بنسبة 100%، اما جين *mrk D* فقد تم الكشف عن وجوده في عزلات بكتريا *K.pneumoniae* ولم تظهر أية عزلة امتلاكها للجين، وهذا ما اشار اليه Alcantar-Curiel *et al.* (2013) الى تواجد جين *mrk D* بنسبة 20% في بكتريا *K.pneumoniae* إذ كانت 14 عزلة من أصل 69 عزلة مشيراً الى ان جميع العزلات التي تمتلك جين *mrk A* قد لا تمتلك جين *mrk D* وهذا يتوافق مع نتائج الدراسات الأخرى التي تشير ان جين *mrk D* يكون اكثر تواجداً في بكتريا *K.oxytoca* من بكتريا *K.pneumoniae* (Langstraat *et al.*, 2001; Hornick *et al.*, 1995)، وأشار Li *et al.* (2014) أن اوبيرون *mrk* الذي يشفر الى خمل النوع الثالث والتي تساهم في التصاق البكتريا بأنسجة الرئة والكلى، ولا تمثل دوراً في اصابة الامعاء، في حين اشار Struve *et al.* (2009) ان خمل النوع الثالث لها دور في استعمار الامعاء.

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions

And

Recommendation

الاستنتاجات والتوصيات Conclusions and Recommendations

الاستنتاجات Conclusions

1. أظهرت بكتريا *K.pneumoniae* هي النوع السائد في العينات المأخوذة من الأطفال الرضع المصابين بالالتهاب المعوي القولوني الناخر وكانت تحتل أعلى نسبة إصابة وجاءت بعدها بكتريا *E.coli* و *P. aeruginosa* و *K.oxytoca* و *E.cloacae* وبكتريا *P.hauseri* بأقل نسبة إصابة.
2. يمكن الاعتماد على عينات الخروج في تحديد نوع الإصابة البكتيرية في الاطفال المصابين بالالتهاب المعوي القولوني الناخر.
3. أظهرت عزلات بكتريا *K.pneumoniae* مقاومتها بنسبة عالية للعديد من المضادات الحيوية المستعملة في الدراسة عند تحديد التركيز المثبط الأدنى (MICs) باستعمال جهاز الفايثك.
4. أظهرت بعض عزلات بكتريا *K.pneumoniae* امتلاكها معاً الخمل من النوع الأول والثالث وأظهرت قدرتها على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm باستعمال طريقة الكونغو الأحمر.
5. تختلف العزلات في امتلاكها لجينات الالتصاق بالاعتماد على مصدر العزلة إذ أظهرت نتائج الكشف عن جينات الضراوة امتلاك بكتريا *K.pneumoniae* كل من الجينات *fim* A و *fim* H و *mrk* A في جميع العزلات وبنسبة 100%، أما جين *mrk* D فلم يظهر في جميع العزلات.

التوصيات Recommendation

1- إجراء دراسات للكشف الجيني عن الخمل من KPC و KPF-28 في الأنواع البكتيرية

المسببة للالتهاب المعوي القولوني الناخر عند الأطفال الرضع.

2- اعتماد طرائق حديثة أخرى للكشف المظهري عن الخمل من النوع الأول والثالث للبكتريا

المسببة للالتهاب المعوي القولوني الناخر عند الأطفال الرضع باستعمال تقنية جهاز

.Fluorescent

3- إجراء دراسات للتحري عن قابلية التصاق البكتريا المسببة للالتهاب المعوي القولوني الناخر

عند الأطفال الرضع على الأنسجة الطلائية والأجهزة الطبية.

4- ضرورة العمل على الخلط بين المضادات للحد من المقاومة المتعددة للبكتريا المسببة

للالتهاب المعوي القولوني الناخر عند الأطفال الرضع.

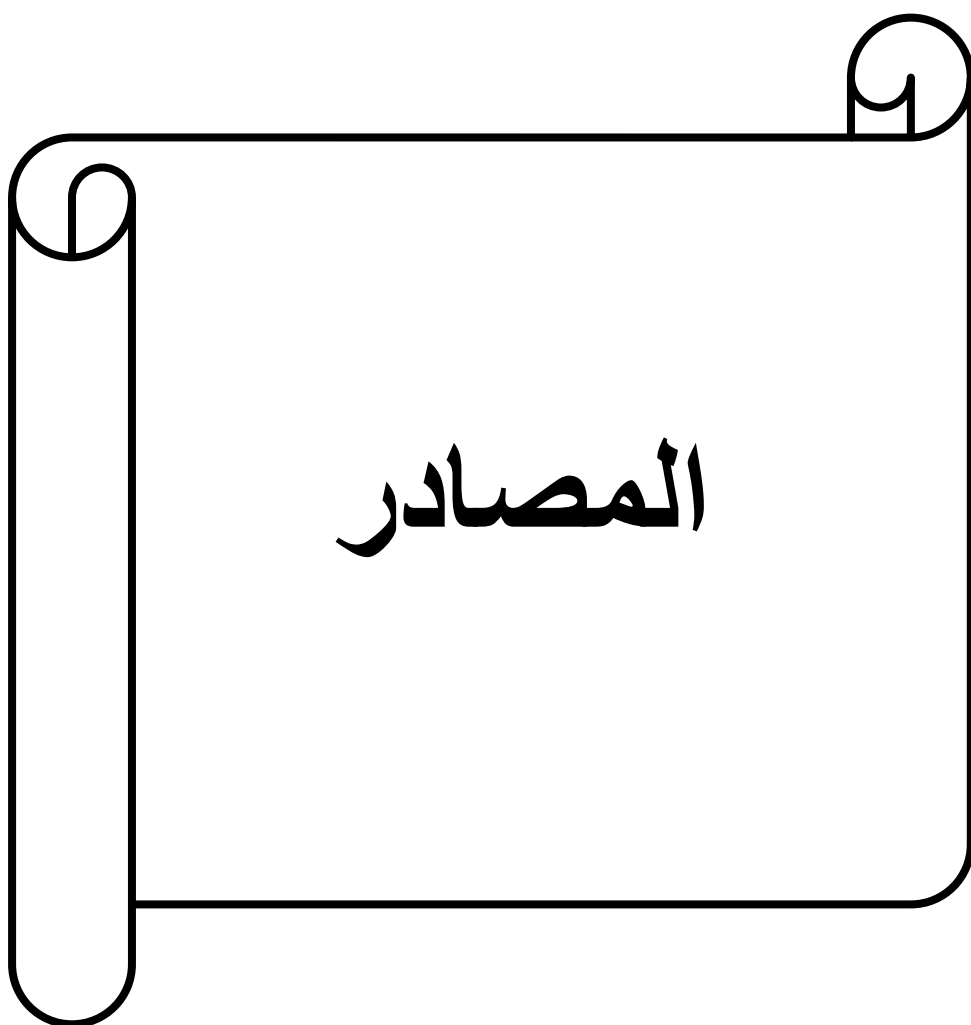
5- دراسة التعبير الجيني للخمل من النوع الأول والثالث.

6- يجب أن تكون هناك طرائق حديثة للتحري عن البكتريا المسببة للالتهاب المعوي القولوني

الناخر عند الأطفال الرضع باستعمال التشخيص المصلي و تفاعل البلمرة المتسلسل

.PCR

7- إجراء دراسات حول امراضية الانواع البكتيرية الاخرى غير السائدة.



المصادر

المصادر العربية

رميض، عبد القادر كريم والمذخوري، حارث جبار فهد. (2015). الكشف عن مورث *bla_{kpc}* في بعض العزلات السريرية للكليبسيلا الرئوية المعزولة من بغداد. المجلة العراقية للعلوم. 56:
(4A): 2861-2853.

المصادر الاجنبية

- Abrahamsohn**, P. A.; Santos, M. F. D. and Zorn, T. M. T. (2005). Basic Histology: Text and Atlas. Mc Graw – Hills Access Medicine. 11/e.
- Ahmed**, T. A.; Haroun, M.; Hussein, A. A.; El-Ashry, E. H. and El-Sayed, L. H. (2012). Development of a New Trend Conjugate Vaccine for the Prevention of *Klebsiella pneumoniae*. Infection Disease Reports, 4 (33): 128 -133.
- Alcantar-Curiel**, M. D.; Blackburn, D.; Saldana, Z.; Gayosso-Vazquez, C. ; Lovine, N. ; Delacruz , M. A. and Giron, J. A. (2013). Multi-functional Analysis of *Klebsiella pneumoniae* Fimbrial Types in Adherence and Biofilm Formation. Virulence. 4(2): 129-138.
- Al-Rubiae**, N. N. K. (2017). The Correlation Between Some Virulent Factors Encoding Genes and Various Immune Parameters of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* Isolated from Urinary Tract Infections. M. Sc. Thesis. Al-mustansiryia University College of Science: 105pp.
- Alwan**, A. H. and Abas, S. M. (2016). Study the Relationship Between the Ability of Biofilms Formation and Antibiotic Sensitivity for *Klebsiella pneumoniae* Isolated From Different Clinical Sources. Al-Mustansiryah Journal for pure Sciences, 16(1):1-9.
- Atlas**, R. M. (2010). Handbook of Microbiology Media. 4th ed. CRC. Press. 2036pp.

- Babakhani, S.;** Shokri, S. and Baharvand, M. (2015). Antibiotic Resistance Pattern of *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Nosocomial Infections in Aleshtar Hospital, Lorestan Province, 1(2): 55-59.
- Balachandran, B.;** Dutta, S.; Singh, R.; Prasad, R. and Kumar, P. (2017). Bovine Colostrum in Prevention of Necrotizing Enterocolitis and Sepsis in Very Low Birth Weight Neonates: A Randomized Double-Blind, Placebo-Controlled Pilot Trial. *Journal of Tropical Pediatrics*, 63:10-17.
- Bombell, S. and McGuire, W.** (2009). Early Trophic Feeding for Very Low Birth Weight Infants. *Cochrane Database System Review*, 8(3): CD000504. Cited by Lau and Chamberlain, 2015.
- Bosch, J. F. V. D.;** Verboom -Sohmer, U.; Postma, P.; Graaff, J. D. and Maclaren, D. M. (1980). Mannose – Sensitive and Mannose – Resistant Adherence to Human Uroepithelial Cells and Urinary Virulence of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 29(1): 226-233.
- Brenner, D. J.;** Krieg, N. R. and Staley, J. R. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2: the Proteobacteria, Part B: The Gamma Proteobacteria*. New York, Springer.
- Brooks, G. F.;** Carroll, K. C.; Butel, J. S.; Morse, S. A. and Mietzner , T. A. (2013). *Jawetz, Melnick, and Adelberg`s Medical Microbiology*. 26th ed. A Lange Medical book: 1 -879.
- Bure, A.;** Legrand, P.; Arlet, G.; Jarlier, V.; Paul, G. and Philppon, A. (1988). Dissemination in Five French Hospitals of *Klebsiella pneumoniae* Serotype K 25 Harboring a new Transferable Enzymatic Resistance to Third Generation Cephalosporins and Aztreonam. *Europe. Journal of Clinical Microbiology Infectious Disease*, 7 (6): 780-782.

- Clements**, A.; Tull, D.; Jenny, A. W.; Farn, J. L.; Kim, S. H.; Bishop, R. E.; Mcphee, J. B.; Hancock, R. E.; Hartland, E. L.; Pearse, M. J.; Wijburg, O. L.; Jackson, D. C.; Mc Conville, M. J. and Strugnell, R. A. (2007). Secondary Acylation of *Klebsiella pneumoniae* Lipopolysaccharide Contributes to Sensitivity to Antibacterial Peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 282(21): 15569 -15577.
- Coggins**, S. A.; Wynn, J. L. and Weitkamp, J- H. (2015). Infectious Causes of Necrotizing Enterocolitis. *Clinical Perinatology*, 42(1): 133-154.
- Cornelissen**, C. N.; Fisher, B. D. and Harvey, R. A. (2015). Lippincott Illustrated Reviews Flash Cards: Microbiology: 1-421.
- Cortes**, G.; Borrell, N.; Astorza, B. D.; Gomez, C.; Sauleda, J. and Alberti, S. (2002). Molecular Analysis of the Contribution of the Capsular Polysaccharide and the Lipopolysaccharide O side Chain to the Virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a Murine Model of Pneumonia. *Infection and Immunity*, 70 (5): 2583-2590.
- Cruz-Cordova**, A.; Esteban-Kenel, V.; Espinosa –Mazariego, K.; Ochoa, S. A.; Espinosa, S. M.; Elhain, A. D. L. G.; Rendon , E. F.; Villegas, E. O. L. and Xicohtencatl-Cortes, J. (2014). Pathogenic Determinants of Clinical *Klebsiella pneumoniae* Strains Associated with their Persistence in the Hospital Environment. *Biology Medical Hospital Infants*, 71 (1): 15-24.
- Darby**, A.; Lertpiriyapong , K.; Sarkar, U.; Seneviratne , U. ; Park , D. S.; Gamazon , E. R. ; Batchelder , C.; Cheung , C. ; Buckley , E. M. ; Taylor, N. S. ; Shen , Z. ;Tannenbaum , S. R. ; Wishnok , J. S. and Fox, J. G. (2014). Cytotoxic and Pathogenic Properties of *Klebsiella oxytoca* Isolated from Laboratory Animals. *PLos One*, 9: e100542.
- Davin-Regli**, A. and Pages, J.M. (2015). *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; Versatile bacterial Pathogens Confronting

Antibiotic Treatment Review. *Frontiers in Microbiology*. 6 (392): 1-10.

Debby, B. D. ; Ganor , O. ;Yasmin M. ; David, L.; Nathan, K. ; Ilana , T. ; Dalit , S. ; Smollan, G. and Galia , R. (2012). Epidemiology of Carbapenem Resistant *Klebsiella pneumoniae* Colonization in an Intensive Care Unit. *Europe Journal Clinical Microbiology. Infectious Disease*, 31(8):1811-1817.

Dimartino, P. ; Livrelli , V. ; Sirot , D. ; Joly , B. and Darfeuille –Michaud, A. (1996). A New Fimbrial Antigen Harbored by CAZ-5/SHV -4 – Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains Involved in Nosocomial Infections . *Infection and Immunity*, 64(6): 2266-2273.

Drzewiecka, D. (2016). Significance and Roles of *Proteus* spp . Bacteria in Natural Environments. *Microbial Ecology*, 72 : 741-758.

Eroschenko, V. P. (2013). Diflore's Atlas of Histology With Functional Correlation. 12th ed . 1-580.

Evrard, B.; Balestrino, D.; Dosgilbert, A.; Bouya-Gachancard, J.L.J.; Charbonnel, N.; Forestier, C. and Tridon, A. (2010). Roles of Capsule and Lipopolysaccharide O Antigen in Interactions of Human Monocyte-Derived Dendritic cells and *Klebsiella pneumoniae* . *Infection and Immunity*, 78 (1): 210-219.

Feltham, K.A.; Power, A.K.; Pell, P.A. and Sneath, P. H (1978). A Simple Method for the Storage of Bacteria *Journal of Applied Bacteriology*. 44:313-316.

Fitzgibbons, SC.; Ching Y.; Yu, D.; *et al.* (2009). Mortality of Necrotizing Enterocolitis Expressed by Birth Weight Categories. *Journal of Pediatric Surgery*, 44:1072-1075.Cited by Lau and Chamberlain, 2015.

- Forbes**, B. A.; Saham , D. F. and Weissfeld , A. S. (2007). Baily and Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. Mosby, Inc. An Anffilliate of Elsevier , Inc. : 957pp.
- Freeman**, D. J. ; Falkiner , F. R. and Keane , C. T. (1989) . New Method for Detecting Slime Production by Coagulase Negative Staphylococci. Journal of Clinical Pathology, 42 (8): 872-874.
- Fresno**, S. ; Jimenez , N. ; Canals , R. ; Merino , S. ; Corsaro , M. M. ; Lanzetta , R. ; Parrilli , M. ; Pieretti , G. ; Regue , M. and Tomas , J. M. (2007). A Second Galacturonic Acid Transferase Is Required for core Lipopolysaccharide Biosynthesis and Complete Capsule Association With the Cell Surface in *Klebsiella pneumoniae*. Journal of Bacteriology, 189 (3): 1128-1137.
- Gad**, G. F.; Mohamed, H. A. and Ashour , H. M. (2011) . Aminoglycoside Resistance Rates , Phenotypes and Mechanisms of Gram – Negative Bacteria from Infected Patients in Upper Egypt. PLOS ONE. 6(2): e17224.
- Gerlach** , G. F. ; Clegg , S. ; Ness , N. J. ; Swenson , D. L. ; Allen , B. L. and Nichols , W. A. (1989). Expression of Type 1 Fimbriae and Mannose – Sensitive Hemagglutinin by Recombinant Plasmids . Infection and Immunity. 57 (3): 764-770.
- Ghafourian**, S. ; Sadeghifard , N. ; soheili , S . and Sekawi , Z. (2015). Extended Spectrum Beta- Lactamases: Definition , Classification and Epidemiology. Issues Molecular Biology. 17: 11-22.
- Ghasemian** , A. ; Mobarez , A. M. and Doust , R. H. (2018) . *Klebsiella oxytoca* : Clinical Significance , Virulence Factors and Developed Antimicrobial Resistance . Romanian Archives of Microbiology and Immunology . 77(2):104-109.
- Greenwood** , D. ; Slack , R. C. B. ; Peutherer , J. F. and Barer , M. R. (2007). Medical Microbiology A Guide To Microbial Infections :

Pathogenesis , Immunity , Laboratory Diagnosis and Control .
16thed . Churchill Livingstone . 2334 pp .

- Grishin** , A. ; Papillon , S. ; Bell , B. ; Wang , J . and Ford , H. R . (2013).
The Role of the Intestinal Microbiota in the Pathogenesis of
Necrotizing Enterocolitis . *Semin Pediatric Surgery* . 22(2): 69-75.
- Hansen** , D. ; Mestre , F. ; ALBerti , S. ; Hernandez-Alles , S. ; Varez , D. ;
Domenech- Sanchez , A. ; Gil , J. ; Merino , S. ; Tomas , J. M . and
Benedi , V. J. (1999). *Klebsiella pneumoniae* Lipopolysaccharide O
Typing: Revision of Prototype Strains and O-Group Distribution
among Clinical Isolates from Different Sources and Countries.
Journal of Clinical Microbiology. 37(1): 56-62.
- Hintz**, S.R.; Kendrick, D.E.; Stoll, B.J.; *et al.* (2005). Neurodevelopmental
and Growth Outcomes of Extremely Low Birth Weight Infants after
Necrotizing Enterocolitis. *Pediatrics*, 115: 696-703. Cited by Lau
and Chamberlain, 2015.
- Ho**, P-L.; Ng, K-Y. ; Lo, W-U; Law, P.Y.; Lai, E. L-Y.; Wang, Y. and
Chow, K-H. (2016). Plasmid –Mediated OqXAB is an Important
Mechanism for Nitrofurantoin Resistance in *Escherichia coli*.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 60(1): 537-543.
- Hornick**, D.B.; Allen, B. L.; Horn, M. A. and Clegg, S. (1991). Fimbrial
Types Among Respiratory Isolates Belonging to the Family
Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*, 29: 1795-1800.
- Hornick**, D.B.; Thommandru, J.; Smits, W. and Clegg, S. (1995).
Adherence Properties of an *mrk D* – Negative Mutant of *Klebsiella
pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 63(5): 2026 -2032.
- Hsieh**, P.F.; Lin, T.L. and Yang, F.L. (2012). Lipopolysaccharide O1
Antigen Contributes to the Virulence in *Klebsiella pneumoniae*
Causing Pyogenic Liver Abscess. *PLOS ONE*. 7(3): e 33155.

- Huovinen, P.;** Sundstrom, L.; Swedberg, G. and Skold, O. (1995). Trimethoprim and Sulfonamide Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39 (2): 279-289.
- Huovinen, P.** (1987). Trimethoprim Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 31 (10): 1451- 1456.
- Johnson, J. G.** (2011) . Regulation of Type 3 Fimbrial Gene Expression in *Klebsiella pneumoniae* . PhD Thesis . Graduate College . University of Iowa . 156pp.
- Klemm, P.** and Christiansen, G. (1987). Three *fim* Genes Required for the Regulation of Length and Mediation of Adhesion of *Escherichia coli* Type 1 fimbriae. *Molecular Genes. Genetics*, 208: 439-445.
- Kothari, S.;** Mishra, V.; Ranjan, N. and Singh, A. (2013). Third Generation Cephalosporin – Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Isolates: an Emerging Threat. *International Journal of Basic and Clinical Pharmacology*, 2(1): 56-60.
- Kwil, I.;** Kazmierczak, D. and Rozalski, A. (2013) . Swarming Growth and Resistance of *Proteus penneri* and *Proteus vulgaris* Strains to Normal Human Serum. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 22 (2): 165 – 175.
- Langstraat, J.;** Bohse, M. and Clegg, S. (2001). Type 3 Fimbrial Shaft (MrKA) of *Klebsiella pneumoniae*, But Not the Fimbrial Adhesin (MrKD), Facilitates Biofilm Formation. *Infection and Immunity*, 69(9): 5805-5812.
- Lee, C-R.;** Lee, J. H.; Park, K. S.; Jeong, J. H.; Kim, Y. B. ; Cha, C- J. ; Jeong, B. C. and Lee, S. H. (2017). Antimicrobial Resistance of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Hypervirulence-Associated Determinants, and Resistance Mechanisms. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7: 1-13.

- Levinson** , W. (2016). Review of Medical Microbiology and Immunology . 14th ed. McGraw – Hill Education , Inc . 821pp.
- Li** , B. ; **Zhao** , Y . ; **Liu** , C . ; **Chen** , Z . and **Zhou** , D. (2014) . Molecular Pathogenesis Of *Klebsiella pneumoniae*. Future Microbiology. 9 (9): 1071-1081.
- Lin** , M. C. ; **Lyles** , R. D . ; **Lolans** , K. ; **Hines** , D . W. ; **Spear** , J. B. ; **Petrak** , R. ; **Trick** , W. E . ; **Weinstein** , R. A. and **Hayden** , M. K. (2013) . The Importance of Long - term Acute Care Hospitals in the Regional Epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Producing Enterobacteriaceae. Clinical Infectious Diseases, 57(9): 1246-1252.
- Livrelli**, V.; **Dechamps**, C.; **Dimartino** , P. ; **Darfeuille-Michaud** , A. ; **Forestier**, C. and **Joly**, B. (1996). Adhesive Properties and Antibiotic Resistance of *Klebsiella*, *Enterobacter*, and *Serratia* Clinical Isolates Involved in Nosocomial Infections. Journal of Clinical Microbiology, 34:1963-1969.
- Llobet**, E.; **Campos**, M. A.; **Gimenez** , P. ; **Moranta** , D. and **Bengoechea** , J. A. (2011). Analysis of the Networks Controlling the Antimicrobial Peptide-Dependent Induction of *Klebsiella pneumoniae* Virulence Factors. Infection and Immunity, 79(9): 3718-3732.
- Llobet** , E. ; **March** , C. ; **Gimenez** , P. and **Bengoechea** , J. A. (2009) . *Klebsiella pneumoniae* OmpA Confers Resistance to Antimicrobial Peptides . Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 53 (1): 298-302.
- Manos**, J . and **Belas** , R . (2006). The Genera *Proteus* , *Providencia* and *Morganella* . Prokaryotes, 6 : 245- 269 .
- March** , C. ; **Cano** , V. ; **Moranta** , D. ; **Llobet** , E. ; **Perez – Gutierrez** , C. ; **Tomas** , J. M. ; **Suarez** , T. ; **Garmendia** , J. and **Bengoechea** , J. A.

- (2013). Role of Bacterial Surface Structures on the Interaction of *Klebsiella pneumoniae* With Phagocytes . PLOS One. 8: e56847.
- Marsik** , F. J. and Nambiar , S. N. (2011). Review of Carbapenemases and AmpC- beta Lactamases. The Pediatric Infectious Diseases journal. 30 (12) : 1094-1095.
- Martin**, CR.; Dammann, O.; Allred, EN.; *et al* . (2010). Neurodevelopment of Extremely Preterm Infants Who had Necrotizing Enterocolitis With Or without Late Bacteremia. Journal of Pediatrics. 157: 751-756. Cited by Lau and Chamberlain, 2015.
- Merino** , S. ; Altarriba , M. ; Izquierdo , L. ; Nogueras , MM. ; Regue , M. and Tomas , JM. (2000). Cloning and Sequencing of the *Klebsiella pneumoniae* O5 *wb* gene Cluster and its Role in Pathogenesis. Infection and Immunity, 68(5):2435-2440.
- Munoz-Price**, L. S.; Poirel, L.; Bonomo, R.; Schwaber, M. J.; Daikos, G. L.; Cormican, M.; Cornaglia, G.; Garau, J.; Gniadkowski, M.; Hayden, M. K.; kumarasamy, K.; Livermore, D.M.; Maya, J. J.; Nordmann, P.; Patel , J. B.; Paterson, D. L., Pitout, J.; Villegas, M. V.; Wang, H.; Woodford, N. and Quinn, J. P. (2013). Clinical Epidemiology of the Global Expansion of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemases. Lancet Infection Disease, 13:785-796.
- Navon-Venezia**, S.; Kondratyeva, K. and Carattoli, A. (2017). *Klebsiella pneumoniae*: a Major Worldwide Source and Shuttle for Antibiotic Resistance. FEMS Microbiology Reviews, 41(3): 252-275.
- Nguyen**, D. N.; Stensballe, A.; Lai, J. C.; Jiang, P.; Brunse, A.; Li, Y.; Sun, J.; Mallard, C.; Skeath, T.; Embleton, N. D.; Berrington, J. E. and Sangild, P. T. (2017). Elevated Levels of Circulating Cell – free DNA and Neutrophil Proteins are Associated With Neonatal Sepsis and Necrotizing Enterocolitis in Immature Mice , Pigs and Infants . Innate Immunity, 23(6):524-536.

- Niveditha, S.;** Pramodhini, S. ; Umadevi , S. ; Kumar , S. and Stephen , S . (2012). The Isolation and the Biofilm Formation of Uropathogens in the Patients With Catheter Associated Urinary Tract Infections (UTIs). *Journal of Clinical and Diagnostic Research* . 6(9): 1478-1482.
- Osei Sekyere , J.** (2018). Genomic Insights in to Nitrofurantoin Resistance Mechanisms and Epidemiology in Clinical Enterobacteriaceae . *Future Science OA*. 4(5).
- Paczosa, M. K.** and Meccas, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80 (3): 629-661.
- Padilla, E.;** Llobet, E.; Domenech-Sanchez, A.; Martinez-Martinez, L.; Bengoechea, J. A. and Alberti, S. (2010). *Klebsiella pneumoniae* AcrAB Efflux Pump Contributes to Antimicrobial Resistance and Virulence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54 (1): 177-183.
- Pan, Y.J.;** Lin, T.L.; Hsu, C.R. and Wang, J.T. (2011). Use of a Dictyostelium Model for Isolation of Genetic Loci Associated with Phagocytosis and Virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 79 (3): 997-1006.
- Podschun, R.** and Ullman, U. (1998) *Klebsiella* spp. As Nosocomial Pathogens Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(4): 589 – 603.
- Raetz, C.R.;** Reynolds, C.M.; Trent, M.S. and Bishop, R.E. (2007). Lipid a Modification Systems in Gram-Negative Bacteria, *Annual. Reviews Biochemicals*, 76: 295 -329.
- Raveh-Sadka, T.;** Thomas, B.; Singh, A.; Firek, B.; Brook, B.; Castelle, C. J.; Sharon, I.; Baker, R.; Good, M.; Morowitz, M. J. and Banfield, J.

F. (2015). Gut Bacteria are Rarely Shared by Co – Hospitalized Premature of NEC Development. *e Live Science* . 4 : e 5477.

Redgrave, L. S.; Sutton, S. B. and Webber, M. A. (2014). Fluoroquinolone Resistance: Mechanisms, Impact on Bacteria and Role in Evolutionary Success. *Trends Microbiology*, 22: 438-445.

Regue, M.; Izquierdo, L.; Fresno, S.; Pique, N.; Corsaro, M. M.; Naldi, T.; Castro, C. D.; Waidelich, D.; Merino, S. and Tomas, J. M. (2005). A Second Outer-Core Region in *Klebsiella pneumoniae* Lipopolysaccharide. *Journal of Bacteriology*, 187 (12): 4198-4206.

Reid, A. N. and Szymanski, C. M. (2009). Biosynthesis and Assembly of Capsular Polysaccharides. *Microbial Glycobiology*, Elsevier Inc, 20: 351-373.

Rosen, D. A.; Pinkner, J. S.; Walker, J. N.; Elam , J. S. ; Jones , J. M. and Hultgren, S. J. (2008). Molecular Variations in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* FimH Affect Function and Pathogenesis in the Urinary Tract. *Infection and Immunity*, 76 (7): 3346-3356.

Rozalski, A.; Torzewska, A.; Moryl, M.; Kwil, I.; Maszewska, A.; Ostrowska, K.; Drzewiecka, D.; Zablotni, A.; Palusiak, A.; Siwinska, M. and Staczek, P. (2012). *Proteus* sp. –An Opportunistic Bacterial Pathogen– Classification, Swarming Growth, Clinical Significance and Virulence Factors. *Folia Biologica Et Oecologica*. 8: 1-17.

Ruiz, E.; Saenz, Y. and Zarazaga, M. (2012). *Qnr*, *aac* (6') –Ib-cr and *qepA* Genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.: Genetic Environments and Plasmids and Chromosomal Location . *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67 : 886-897.

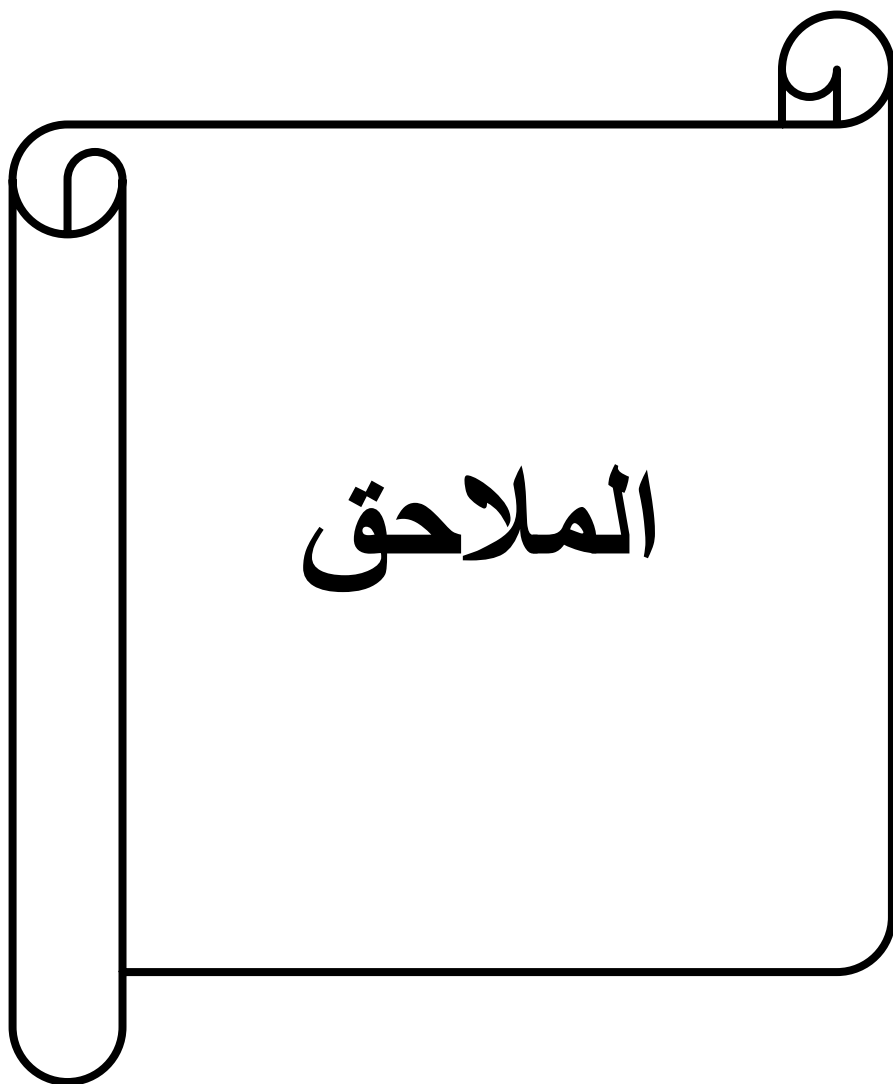
Ryan, K. J. and Ray, C. G. (2004). *Sherris Medical Microbiology*. 4th ed Library of congress.

- Sanders, W. E. J - R. and Sanders, C. C. (1997).** *Enterobacter* spp.: Pathogens Poised to Flourish at the Turn of the Century. *Clinical Microbiology Reviews*, 10 (2): 220-241.
- Schanler, R.J.; Shulman, R.J.; Lau C.; et al. (1999).** Feeding strategies for Premature Infants: Randomized Trial of Gastrointestinal Priming and Tube – Feeding Method. *Pediatrics*, 103: 434-439. Cited by Lau and Chamberlain, 2015.
- Schroll, C.; Barken, K. B.; Krogfelt, K. A. and Struve, C. (2010).** Role of Type 1 and Type3 Fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* Biofilm Formation. *Biological Medicine Central Microbiology*, 10: 179.
- Schultsz, C. and Geerlings , S. (2012) .** Plasmid – Mediated Resistance in Enterobacteriaceae: Changing Landscape and Implications for Therapy. *Drugs*, 72 : 1-16.
- Schurtz, T. A.; Hornick, D. B.; Korhonen, T. K. and Clegg, S. (1994).** The Type 3 Fimbrial Adhesin Gene (*mrkD*) of *Klebsiella* Species Is Not Conserved Among All Fimbriate Strains. *Infection and Immunity* .62(10): 4186-4191.
- Sebghati, T. A. S.; Korhonen, T. K.; Hornick, D. B. and Clegg, S. (1998).** Characterization of the Type 3 Fimbrial Adhesins of *Klebsiella* Strains. *Infection and Immunity*, 66 (6): 2887-2894.
- Seifi, K.; Kazemian, H.; Heidari, H.; Rezagholizadeh, F.; Saeed, Y.; Shirvani, F. and Hourii, H. (2016).** Evaluation of Biofilm Formation among *Klebsiella pneumoniae* Isolates and Molecular Characterization by ERIC –PCR. *Jundishapur Journal Microbiology*, 9(1): e 30682.
- Sharmeen, R.; Hossain, M. N.; Rahman, M. M.; Foyosal, M. J. and Miah, M. F. (2012).** In-Vitro Antibacterial Activity of Herbal Aqueous Extract Against Multi – Drug Resistant *Klebsiella* sp. Isolated from Human Clinical Samples. *International Current Pharmaceutical Journal*. 1(6): 133-137.

- Shon, A. S.; Bajwa, R. P. S. and Russo, T. A. (2013).** Hypervirulent (Hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. *Virulence*. 4(2): 107-118.
- Singh, C. L.; Cariappa, C. M. P. and Kaur, L. C. M. (2016).** *Klebsiella oxytoca*: An Emerging Pathogen. *Medical Journal Armed Forces India*, 72: s59-s61.
- Singhai, M.; Malik, A.; Shahid, M.; Malik, M. A. and Goyal, R. (2012).** A Study on Device – Related Infections With Special Reference to Biofilm Production and Antibiotic Resistance. *Journal of Global Infectious Diseases*, 4: 193-198.
- Smith, B.; Bode, S.; Skoy, T.H.; et al. (2012).** Investigation of the Early Intestinal Microflora in Premature Infants with / without Necrotizing Enterocolitis. Using Two Different Methods. *Pediatrics Respiratory*, 71: 115-120. Cited by Lau and Chamberlain, 2015.
- Srinivasan, V. B. and Rajamohan, G. (2013).** KpnEF, a New Member of the *Klebsiella pneumoniae* Cell Envelope Stress Response Regulon, IS an SMR- Type Efflux Pump Involved in Broad – Spectrum Antimicrobial Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(9): 4449-4462.
- 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 Immunology Medical Microbiology*, 65:350-359.
- Struve, C.; Bojer, M. and Krogfelt, K. A. (2009).** Identification of a Conserved Chromosomal Region Encoding *Klebsiella pneumoniae* Type 1 and Type 3 Fimbriae and Assessment of the Role of Fimbriae in Pathogenicity. *Infection and Immunity*, 77(11): 5016-5024.

- Struve, C.;** Bojer, M. and Krongfelt, K. A. (2008). Characterization of *Klebsiella pneumoniae* Type 1 fimbriae by Detection of Phase Variation During Colonization and Infection and Impact on Virulence. *Infection and Immunity*, 76 (9): 4055-4065.
- Tadesse, A. and Alem, M.** (2006). *Medical Bacteriology*. 433pp.
- Tille, P. M.** (2014). *Baily and Scotts Diagnostic Microbiology*. 12th ed., Mosby, Inc., An Affiliate of Elsevier, Inc. 1038pp.
- Torrazza, RM.;** Li, N. and Neu, J. (2014). Decoding the Enigma of Necrotizing Enterocolitis in premature Infants. *Pathophysiology*, 21:21-27. Cited by Lau and Chamberlain, 2015.
- Trivedi, M. K.;** Patil, S.; Shettigar, H.; Bairwa, K. and Jana, S. (2015). Phenotypic and Biotypic Characterization of *Klebsiella oxytoca*; An Impact of Biofield Treatment. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 7(4): 202-205.
- Vandepitte, J.;** Verhaegen, J.; Engbaek, K.; Rohner, P.; Piot, P. and Heuck, C. C. (2003). *Bacteriological Investigations In: World Health Organization. 2^{ed} ed. Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology*, WHO. Geneva: 167pp.
- Wang, Z.C.;** Huang, C.J.; Huang, Y.J.; Wu, C.C. and Peng, H.L. (2013). FimK Regulation on the Expression of Type 1 Fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* CG43 S3. *Microbiology*, 159: 1402-1415.
- Warner, B. B.;** Deych, E.; Zhou, Y. Z.; Hall – Moore, C.; Weinstock, G. M.; Sodergren, E.; Shaikh, N.; Hoffmann, J. A.; Linneman, L. A.; Hamvas, A.; Khanna, G.; Rouggy – Nickess, L. C.; Ndao, I . M.; Shands, B. A.; Escobedo, M.; Sullivan, J. E.; Radmacher, P.G.; Shannon, W. D. and Tarr, P. I. (2016). Gut Bacteria Dysbiosis and Necrotizing Enterocolitis in Very Low Birth Weight Infants: A prospective Case – Control Study. *Lancet*, 387: 1928-1936.

- Wu, C.C.;** Huang, Y.J.; Fung, C.P. and Peng, H.L. (2010). Regulation of the *Klebsiella pneumoniae* Kpc Fimbriae by the Site-Specific Recombinase Kpcl. *Microbiology*, 156:1983-1992.
- Yu, F.;** Wang, L. ; Pan , J. ; Yao , D. ; Chen , C. ; Zhu , T. ; Lou , Q . ; Hu, J.; Wu. Y.; Zhang, X.; Chen, Z. and Qu, D. (2009). Prevalence of 16srRNA Methylase Genes in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from a Chinese Teaching Hospital: Coexistence of *rmtB* and *arm A* Genes in the Same Isolate. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 64:57-63.
- Zheng, J- X.;** Lin, Z-W.; Chen, C.; Chen, Z.; Lin, F-J.; Wu, Y.; Yang, S-Y.; Sun . X.; Yao, W- M.; Li, D- Y.; Yu , Z. J.; Jin, J-L.; Qu, D. and Deng, Q-W. (2018). Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia Strains Was Found to be Associated With CC23 and the Presence of *WcaG*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8: 1-9.



الملاحق

ملحق (1) الاختبارات الكيموحيوية لتشخيص العزلات البكتيرية

KIA				البوريز	فوكس بروسكاور	احمر الميثيل	اختزال السترات	الانزول	الكتايفز	الاوكتديز	العزلة	الرمز	المصدر
CO ₂	H ₂ S	Bult	Slant										
-	-	Acid	Acid	-	-	+	-	+	+	-	<i>E. coli</i>	St2	الخروج Stool
+	-	Acid	Acid	+	+	-	+	-	+	-	<i>K. pneumoniae</i>	St3	
-	-	Acid	Acid	+	-	-	+	-	+	+	<i>P. aeruginosa</i>	St4	
+	-	Acid	Acid	+	+	-	+	-	+	-	<i>K. pneumoniae</i>	St5	
-	-	Alkaline	Alkaline	-	-	-	+	-	+	+	<i>P. aeruginosa</i>	St6	
-	-	Acid	Alkaline	+	-	+	+	-	+	+	<i>P. aeruginosa</i>	St7	
-	-	Alkaline	Alkaline	+	-	+	+	-	+	+	<i>P. aeruginosa</i>	St8	
+	-	Acid	Alkaline	+	+	-	+	-	+	-	<i>K. pneumoniae</i>	St9	
+	-	Acid	Acid	+	+	-	+	+	+	-	<i>K. oxytoca</i>	St12	
-	-	Acid	Alkaline	+	+	-	+	-	+	-	<i>K. pneumoniae</i>	St15	
-	-	Acid	Acid	+	+	-	+	-	+	-	<i>K. pneumoniae</i>	St16	
-	-	Alkaline	Alkaline	+	+	-	+	-	+	-	<i>K. pneumoniae</i>	St17	
+	-	Acid	Acid	-	-	+	-	+	+	-	<i>E. coli</i>	St19	
+	-	Acid	Acid	-	-	+	-	+	+	-	<i>E. coli</i>	St20	
-	-	Acid	Acid	+	+	-	+	-	+	-	<i>K. pneumoniae</i>	St21	
+	-	Acid	Acid	-	-	+	-	+	+	-	<i>E. coli</i>	St22	
+	-	Acid	Acid	+	+	-	+	-	+	-	<i>K. pneumoniae</i>	St23	
+	-	Acid	Acid	±	+	-	+	-	+	-	<i>E. cloacae</i>	St26	
-	-	Acid	Acid	-	-	+	-	+	+	-	<i>E. coli</i>	St27	
+	-	Acid	Acid	+	+	-	+	-	+	-	<i>K. pneumoniae</i>	St28	
-	+	Acid	Alkaline	+	-	+	-	+	+	-	<i>Proteus hauseri</i>	St29	
+	-	Acid	Alkaline	-	+	-	+	-	+	-	<i>E. cloacae</i>	St30	
-	-	Acid	Acid	+	+	-	+	-	+	-	<i>K. pneumoniae</i>	St31	
-	-	Alkaline	Alkaline	+	+	-	+	-	+	-	<i>K. pneumoniae</i>	St32	
-	-	Acid	Acid	+	+	-	+	-	+	-	<i>K. pneumoniae</i>	St33	
-	-	Acid	Alkaline	-	-	+	-	+	+	-	<i>E. coli</i>	St34	
-	-	Acid	Alkaline	+	+	-	+	-	+	-	<i>K. pneumoniae</i>	St36	
-	-	Acid	Acid	+	+	-	+	-	+	-	<i>K. pneumoniae</i>	St37	
+	-	Acid	Alkaline	+	+	-	+	-	+	-	<i>K. pneumoniae</i>	St38	
-	-	Acid	Alkaline	+	+	-	+	-	+	-	<i>K. pneumoniae</i>	St39	
+	-	Alkaline	Alkaline	+	+	-	+	-	+	-	<i>K. pneumoniae</i>	St40	

KIA													
CO ₂	H ₂ S	Bult	Slant	اليورينز	فوكس بروسكلور	احمر الميثيل	اختزال السترات	الانحول	الكثايز	الأكسيديز	العزلة	الرمز	المصدر
-	-	Acid	Alkaline	+	+	-	+	-	+	-	<i>K. pneumoniae</i>	St42	الخروج Stool
-	-	Acid	Acid	+	+	-	+	+	+	-	<i>K. oxytoca</i>	St43	
-	-	Acid	Alkaline	+	+	-	+	-	+	-	<i>K. pneumoniae</i>	St44	
+	-	Acid	Alkaline	+	+	-	+	-	+	-	<i>K. pneumoniae</i>	St46	
-	-	Acid	Acid	+	+	-	+	-	+	-	<i>K. pneumoniae</i>	St47	
-	-	Acid	Alkaline	+	+	-	+	-	+	-	<i>K. pneumoniae</i>	St48	
-	-	Acid	Alkaline	+	+	-	+	-	+	-	<i>K. pneumoniae</i>	St49	
-	-	Acid	Alkaline	+	+	-	+	-	+	-	<i>K. pneumoniae</i>	B7	الدم
+	-	Acid	Alkaline	+	+	-	+	-	-	-	<i>K. pneumoniae</i>	B36	Blood
-	-	Acid	Acid	+	+	±	+	-	+	-	<i>K. pneumoniae</i>	U4	اليول Urine
+	-	Acid	Acid	-	-	+	-	+	+	-	<i>E. coli</i>	U5	
+	-	Acid	Acid	-	-	+	-	+	+	-	<i>E. coli</i>	U11	

**KIA=Kligler Iron Agar, K=Klebsiella , E=Escherichia , P=Proteus ,
E=Enterobacter , P=Pseudomonas**

ملحق (2) بيانات من الاختبارات الكيموحيوية لتشخيص العزلات البكتيرية باستعمال جهاز الفايترك

Vitek-2 Compact System GN-Card

BioMerieux Customer:
System #:

Laboratory Report

Printed May 7, 2018 09:03 CDT
Printed by: LabAdmin

Isolate Group: 42-1

Bench: other

Card Type: GN Testing Instrument: 00001708849F (14481)

Bionumber: 6607715753565313

Organism Quantity:

Comments:	

Identification Information	Card:	GN	Lot Number:	2410328203	Expires:	Oct 20, 2018 13:00 CDT
	Completed:	May 6, 2018 21:44 CDT	Status:	Final	Analysis Time:	10.00 hours
Selected Organism	69% Probability <i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i> Bionumber: 6607715753565313 Confidence: Good identification					
SRF Organism						
Analysis Organisms and Tests to Separate:						
Analysis Messages:						
Contraindicating Typical Biopattern(s) <i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i> IMLTa(91),BXYL(99),ELLM(2).						

Biochemical Details																	
2	APPA	-	3	ADO	+	4	PyrA	+	5	IARL	-	7	dCEL	+	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	+
17	BGLU	+	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAIap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	+	29	TyrA	+	31	URE	+	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	38	CIT	+	37	MNT	+	39	SKG	-
40	ILATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	+	45	PHOS	+
46	GlyA	+	47	ODC	-	48	LDC	+	53	IHISa	+	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	+	64	ILATa	+			

Installed VITEK 2 Systems Version: 07.01
MIC Interpretation Guideline:
AES Parameter Set Name:Therapeutic Interpretation Guideline:
AES Parameter Last Modified:

ملحق (3) مصدر العينات واعداد العزلات البكتيرية المعزولة من الاطفال المرضى بالالتهاب المعوي القولوني الناخر

عدد العزلات السالبة لصبغة كرام	عدد العزلات	البكتريا المعزولة	عدد العينات الموجبة النمو	مصدر العينة	عدد العينات الكلية
38	23	<i>K. pneumoniae</i>	41	الخروج	64
	4	<i>P. aeruginosa</i>			
	2	<i>K. oxytoca</i>			
	6	<i>E. coli</i>			
	1	<i>Proteus hauseri</i>			
	2	<i>E. cloacae</i>			
	3	G+			
2	2	<i>K. pneumoniae</i>	14	الدم	
	12	G+			
3	1	<i>K. pneumoniae</i>	5	البول	
	2	<i>E. coli</i>			
	2	G+			
43	60		60	المجموع الكلي	

Summary

This study was conducted to isolate and identification of bacterial from infants infected with Necrotizing Enterocolitis.

Sixty four clinical samples from infected infants with NEC were collected from the children protection hospital of the Medical city in Baghdad were included (41) samples from stool and (14) samples from Blood and (9) samples from urine for the period from January 2018 to April 2018.

All samples were cultured on MacConkey and Blood agar. All isolates were identification depending on macroscopic microscopic, and biochemical test as well as definite with Vitek-2 compact system, (43) isolates were obtained from patients (26) isolates belonged to *K.pneumoniae* (60.46%), 8 isolates to *E.coli* (18.60%), 4 isolates diagnosed as *P.aeruginosa* (9.30 %), 2 isolates to *K.oxytoca* (4.65%), 2 isolates to *E.cloacae* (4.65%) and one isolate to *P.hauseri* (2.32%).

The results showed that *K.pneumoniae* was the predominant 26 (88.46 %) isolates from stool, 2(7.69%) from blood and 1(3.84%) isolate from urine.

The results of the investigation of some virulence factors revealed that all *K. pneumonia* isolates were able to attachment by the fimbriae of type 1 (T1f) 61.54% and type 3 (T3f) 38.46% and were able to form biofilm to using congo red agar method.

The results also showed the ability most of *K.pneumoniae* isolates to form biofilm on congo red agar media where it 16(53.84%) isolates of 26 isolates which belong to *K.pneumoniae* were able to form biofilm strongly and 10 (38.46%) isolates were able to form biofilm moderately, while 2(7.7%) isolates were unable to form biofilm.

Results of the sensitivity test shown by using Vitek-2 compact system was its more efficient than the traditional methods towards 18 antibiotics to determine the Minimum inhibitory concentration (MICs).

The results showed that all *K.pneumoniae* isolates were 100% resistant to ampicillin and amoxicillin, while were 96.15% resistance to piperacillin and 88.46% of isolates were resistant to Cefazolin, Ceftazidime, Ceftriaxone, Cefepime and Trimethoprim/Sulfamethoxazole, 73% to Ampicillin/Sulbactam, 61.54% to Cefoxitin, 57.70% to Meropenem and Tobramycin, 50% to Amikacin and Gentamicin, 38.46% to Ertapenem and Ciprofloxacin, 23.07% to Levofloxacin, 15.38% to Nitrofurantoin, whereas the bacterial isolates were moderately resistant to Ampicillin / Sulbactam and Levofloxacin to reach 19.23% and to Meropenem 3.84% and to Ciprofloxacin 7.69% and to Nitrofurantoin 53.84%.

In this study the investigation of some of the virulence genes to *K.pneumoniae* bacteria was done, these genes included both *fimA* and *fimH*, which encodes for the fimbriae adhesion protein which belong to type 1 and genes *mrkA* and *mrkD*, of this investigation which encodes for fimbriae adhesion which belong to type 3. The results showed presence of *fimA*, *fimH* and *mrkA* genes with 100% in all the isolates, while the *mrkD* gene was not detected in all isolates.

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education and Scientific Research
Baghdad University
College of Education for Pure Sciences / Ibn Al Haitham
Department of Biology



Bacteriological and molecular study of Necrotizing enterocolitis in infants

A Thesis submitted

To the Council of the College of Education For Pure Sciences /
Ibn Al-Haitham / University of Baghdad as a Partial fulfillment
of the Requirements for the Degree of Master of Sciences in
Biology /Microbiology

By

Abdul-Kareem Anad Hmood

Bachelor of Science in Biology / College of Education for Pure
Sciences / Ibn Al-Haitham - University of Baghdad 2000-2001

Supervised By

Dr. Luma Abdalhady Zwain

2019AD

1440 AH