

دولة ليبيا

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



جامعة سرت - كلية العلوم



قسم التقنيات الحيوية

بحث مقدم لاستكمال متطلبات الحصول على درجة البكالوريوس

بعنوان

دراسة ارتباط جينات المقاومة للمضادات الحيوية بلازميد المقاومة

في عينة من بكتريا *Klebsiella Pneumoniae*

إعداد الطالبتان :

دنيا عبد الخالق محمد ابراهيم

أنعام اشباط ابراهيم السنوسي

تحت إشراف :

أ.د. احمد علي الجنة

العام الجامعي
2019-2018

تم تنفيذ هذه الدراسة في إطار برنامج التعاون بين قسم

التقنيات الحيوية بكلية العلوم جامعة سبها ومركز التقنيات

الحيوية/ فرع سبها ومركز البحوث الطبية فرع سبها

والله

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿قَالُوا سُبْحَانَكَ لَا عِلْمَ لَنَا إِلَّا

مَا عَلَّمْتَنَا إِنَّكَ أَنْتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ﴾

صدق الله العظيم

الافتقار

**بدأنا بأكثر من يد وعانينا الكثير من الصعوبات وما نحن اليوم
والحمد لله نظوي سهر الليالي وتعب الأيام وخلاصة مشوارنا نهدي
هذا العمل**

إلى من بلغ الرسالة وأدى الأمانة .. ونصح الأمة .. إلى نبي الرحمة ونور العالمين .

سيدنا محمد صلى الله عليه وسلم

إلى من ضحن بكل شيء لنكون لهن كل شيء إلى من علمنا ان الحياه صبر وكفاح
وان طريقق الألف ميسل بيبدأ بخطوة.

أمهاتنا اطل الله في عمرهن

إلى من كاهنم الله بالهيبة والوقار ..
إلى من نحمل أسمهم بكل افتخار أرجو من الله ان يسكنهم فسيح جناته .

أبننا رحمة الله عليهم

إلى من أشهد بهم أزمي .

أخوتي وأخواتي

إلى كل قلب خفق حباً ووفاءً لي أهدي ثمرة جهدي .

كلمة شكر

((كن عالم فإن لم تستطع فكن متعلما فإن لم تستطع فأحب

العلماء فإن لم تستطع فلا تبغضهم))

نشكر الله مولانا وخالقتنا الذي منا علينا بإتمام هذا العمل
نود في بادي الأمر أن نعبر عن شكرنا وتقديرنا إلى
الأستاذ الدكتور **أحمد علي الجنقة** لما قدمه لنا
من عون وتوجيهات سديدة طوال فترة البحث , ورفده لنا بالمعلومات ,
فقد أعطانا نموذج رائداً يجمع بين سعة المعرفة
وتواضع العلم والخلق الرفيع .

كما نتقدم بجزيل الشكر إلى الدكتورة **خديجة محمد احمد**
و الأستاذ **شمسي عبد الله محمد** , اللذان لم يبخلا علينا بتوجيهاتهم
ونصائحهم القيمة التي كانت عوناً لنا في اتمام هذا البحث .

كما نتقدم بـوافر الشكر والتقدير والامتنان
إلى المهندس **رفعت شباط ابراهيم** , لما قدمه لنا من عون ومساعدة في
إتمام هذا البحث .

كما نتقدم بجزيل الشكر إلى موظفي **مختبر سبها المركزي**
وموظفي **المتحف الميكروبي بمستشفى سبها الطبي** .

كما لا يفوتنا أن نشكر **زميلاتنا** داعيين الله لهم بدوام النجاح والتوفيق .

فهرس المحتويات

رقم الصفحة	الموضوع	التسلسل
3	الآية	
4	الإهداء	
5	كلمة الشكر	
6	فهرس المحتويات	
8	فهرس الأشكال	
9	فهرس الجداول	
الفصل الأول - المقدمة		
10	المقدمة Introduction :-	1.1
11	الهدف من الدراسة :-	1.1
الفصل الثاني - الدراسات السابقة		
12	العائلة المعوية Enterobacteriaceae	1.2
12	بكتيريا الكليسيلا Klebsilla.Pneumonia	2.2
13	تصنيف بكتيريا الكليسيلا Klebsilla.Pneumonia	1.2.2
13	وبائية بكتيريا الكليسيلا Epidemiology of Klebsilla	2.2.2
14	الأمراضية Pathogenicity of Klebsilla	3.2.2
14	بكتيريا المستخدمة في التحول الوراثي	3.2
14	تصنيف بكتيريا إيشيريكيا القولون Escherichia coli	1.3.2
15	عوامل الضراوة Virulence factor	4.2
15	مستضدات المحفظة Capsule Antigen	1.4.2
16	القدرة على الالتصاق Ability of Adhesion	2.4.2
16	الهيموليسين البكتيريا Bacterial Heamolysin	3.4.2
17	أنزيم اليوريز Urease Enzyme	4.4.2
17	البكتريوسين Bacteriocin	5.4.2
18	الغشاء الحيوي Biofilm	6.4.2
18	ارتباط المقاومة ببلازميد الخلية	5.2
20	المضادات الحيوية Antibiotics	6.2
20	مضادات البيتا لاكتام	1.6.2
20	البنسلينات Pencillins	1.1.6.2
20	بنسلينات محدد الطيف	1.1.1.6.2
21	بنسلينات واسعة الطيف	2.1.1.6.2
21	مضادات سيفالوسبورينات Cephalosporins	2.6.2
21	مجموعة المونوباكتام Monobactam	3.6.2

رقم الصفحة	الموضوع	التسلسل
21	الكاربابانيم Carbapenms	4.6.2
22	مجموعة مضادات الامينوكلايكوسيدية Aminoglycosides	5.6.2
23	الكوينولونات Quinolones	6.6.2
23	الكلورامفينيكول Chloramphenicol	7.6.2
23	التتراسايكلين Tetracycline	8.6.2
23	مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية	7.2
25	الأنزيمات المثبطة للمضادات الحيوية	8.2
26	البلاميدات	9.2
الفصل الثالث – المواد وطرق العمل		
27	المواد	1.3
33	طرق العمل	2.3
34	تحضير محاليل	1.2.3
35	جمع العينات samples collection	2.2.3
36	تنمية عينات البكتيريا العينات GROWTH OF BACTERIAL SAMPLE	3.2.3
37	اختبار الحساسية للمضادات الحيوية Anitibiotic Susceptibility Test	4.2.3
38	استخلاص DNA البلازميدي Extractron DNA Plasmid	5.2.3
39	الترحيل الكهربائي لـ DNA في هلام الأجاروز Gel Electrophoresis	6.2.3
40	التحول الوراثي	7.2.3
41	اختبار النسخ الكلوني REPLICA (الارتباط الجيني Gene Linkage)	8.2.3
الفصل الرابع – النتائج		
43	نتائج اختبار الحساسية	1.4
45	نتائج استخلاص الـ DNA البلازميدي	2.4
46	نتائج التحول الوراثي	3.4
48	نتائج الارتباط الجيني	4.4
الفصل الخامس – المناقشة و تحليل النتائج		
49	المناقشة وتحليل النتائج	1.5
الفصل السادس – الخلاصة و التوصيات		
51	الخلاصة	1.6
52	التوصيات	2.6
المصادر		

فهرس الأعمال

رقم الصفحة	الشكل	التسلسل
12	الشكل (1) يوضح بكتيريا Klebsiella	1
15	الشكل (2) يوضح بكتيريا E.Coli	2
25	شكل (3) يوضح انتقال المادة الوراثية بين الخلايا البكتيرية	3
29	شكل (4) يوضح جهاز الثقب الكهربائي Electroporation	4
30	الشكل (5) يوضح جهاز الأشعة فوق بنفسجية	5
30	الشكل (6) يوضح غرفة الزرع	6
30	الشكل (7) يوضح الحضانة الهوائية	7
31	شكل (8) يوضح جهاز الطرد المركزي	8
31	الشكل (9) يوضح جهاز الترحيل الكهربائي	9
31	الشكل (10) يوضح الميزان الحساس (Delicate scales)	10
32	الشكل (11) يوضح حمام مائي (Water Bath)	11
32	الشكل (12) يوضح جهاز التعقيم (Autoclave)	12
32	الشكل (13) يوضح حاضنة هزازة	13
34	شكل (14) يوضح أداة النسخ الكلوني	14
35	شكل (15) يوضح بكتيريا الكليبيلا الرئوية على وسط مكوني الصلب .	15
36	الشكل (16) يوضح أطباق تحتوي على المضادات الحيوية	16
43	شكل (17) يوضح نتائج اختبار المضادات الحيوية لعزلاتا K.Pneumonia	17
44	شكل (18) يوضح النسبة المئوية لمقاومة بكتريا K.Pneumoniae للمضادات الحيوية المختلفة	18
45	شكل (19) يوضح نتائج استخلاص جزيئة الـ DNA لبكتريا الكليبيلا	19
46	شكل (20) يوضح إختبار الحساسية لبكتريا E.Coli	20
46	شكل (21) يوضح نتائج التحول الوراثي لخلايا الـ E.Coli المعاملة بواسطة الـ DNA البلازميدي مقارنة بالكنترول لعينة 193 على طبق يحتوي مضاد CRO	21
47	شكل (22) يوضح نتائج التحول الوراثي لخلايا الـ E.Coli المعاملة بواسطة الـ DNA البلازميدي مقارنة بالكنترول لعينة 167 على طبق يحتوي مضاد CRO	22
47	شكل (23) يوضح نتائج التحول الوراثي لخلايا الـ E.Coli المعاملة بواسطة الـ DNA البلازميدي مقارنة بالكنترول لعينة 193 على طبق يحتوي مضاد CN	23
48	شكل (24) يوضح نتائج التحول الوراثي لخلايا الـ E.Coli المعاملة بواسطة الـ DNA البلازميدي مقارنة بالكنترول لعينة 167 على طبق يحتوي مضاد CN	24
48	شكل (25) يوضح نتائج الأرتباط الجيني	27

فهرس الجردون

رقم الصفحة	الجدول	التسلسل
27	الأجهزة والمواد المستعملة 1.1.3	1
28	المواد الكيمائية 2.1.3	2
29	الأوساط الزراعية المستخدمة 3.1.3	3
29	جدول يتضمن المضادات المستخدمة في اختبار الحساسية 4.1.3	4
37	المضادات الحيوية المستخدمة وأقطار منطقة التثبيط القياسية (CLSI)	5
44	جدول يبين الأنماط المظهرية للكليسيلا الرئوية ذات المقاومة المتعددة	6

المقدمة

1. المقدمة Introduction :-

إن ظهور وانتشار مضادات الحيوية بين أنواع سلالات البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة جرام جعل من هذه البكتيريا تكتسب صفة المقاومة ضد مضادات الحيوية , نظراً للانتقال جينات المقاومة فيما بينها , احد أهم أمثلة البكتيريا المقاومة للأعداد من مضادات الحيوية *Klebsiella Pneumonia* ويسمى هذا النوع من البكتيريا ببكتيريا المقاومة للأدوية المتعددة Multiple Druqresistant . [التومي عبد الرزاق وآخرون ., 2013] .

وهي عصيات مستقيمة سالبة لصبغة الجرام , تنتمي لعائلة المعوية Enterobacteriaea ، غير متحركة , غير مكونه للأبواغ , هوائية أو لا هوائية اختيارية , تخمر السكر وتشكل مستعمرات وردية اللون مخاطية وملساء على الأوساط الغذائية.

وتكون بكتيريا *K.Pneumonia* من الممرضات الانتهازية Opportunistic Pathogens و المقاومة لعملية البلعمة لاحتوائها على المحفظة , والتي تصيب أشخاص ضعيفي المناعة Immunocompromise . [Umhe et al.,2006] .

وتعد ثاني أخطر عامل ممرض مهدد للصحة العامة بعد الاشريشيا القولونية *E.coli* بحسب تقارير منظمة الصحة العالمية WHO عام 2014 ، وذلك بسبب انتشارها في المستشفيات وخاصة غرف العناية المركزة ICUs , الأمر الذي ساعد في اكتسابها خاصية مقاومة اتجاه مضادات الحيوية وتطویر آلياتها , فهي تسبب العديد من الأمراض ومنها التهاب القناة البولية Urinary Tract Infection و القناة التنفسية وجروح العمليات Surgical Wounds والسحايا Meningitis و إصابات الأذن الوسطى و تعفن الدم Bacteremia حيث بين الباحث

"Cortes" وزملاءه في دراسة أجريت في أسبانيا قدرة جراثيم الكلبسيلا الرئوية على التسبب بالتهاب الرئة [Kumar and Talwar., 2010] .

كما تمتلك العديد من عوامل الضراوة كمستضدات المحفظة Capsule , و الأهداب Fimbria , وطبقة متعدد السكريد الشحمي LPS , و أنزيم اليوربيز Urease , وقدرتها على تشكيل الأغشية الحيوية Biofilms , و تمتاز هذه البكتريا بمقاومتها للمضادات الحيوية ، إذ تستطيع مقاومة مضادات البيتا لاكتام عن طريق إنتاجها لأنزيمات البيتا لاكتاميز التي تعمل على تحطيم حلقة البيتا لاكتام وجعلها جزيئات غير فعالة حيويًا [Naas et al.,2003] .

حيث تختلف المقاومة على حسب كمية الأنزيم المفرز وعلى حسب نشاط هذا الأنزيم [دليمي تساهيل عام، 2017] , و تمتاز أيضاً بقدرتها على اكتساب جينات المقاومة للمضادات الحيوية التي تتحصل عليها بإحدى طرق انتقال الحامض النووي فتقوم البكتريا بهذه العملية لكي تتكيف مع الظروف الإنتقائية التي يقوم بها الإنسان , حيث توجد هذه الجينات المسؤولة عن المقاومة على البلازميد الذي يعرف بـ R-Plasmide فاننتقال هذه البلازميدات من خلية بكتيرية إلى أخرى ينتج عنها انتقال جينات المقاومة [Gascon., 2000].

1.1 الهدف من الدراسة :-

جاءت هذه الدراسة لتهدف إلى البحث عن تواجد الكروموسومات الإضافية (البلازميد) وارتباطها بجينات المقاومة الدوائية للمضادات الحيوية الموجودة في عزلات بكتريا الكلبسيلا المتواجدة في المتحف الميكروبي بمختبر سبها الطبي و المعزولة من قسم الحاضنات , لتحقيق هذا الهدف تم وفق البرنامج التالي :

- (1) الحصول على عزلات من بكتريا الكلبسيلا من المتحف الميكروبي في مختبر سبها الطبي .
- (2) دراسة تحسس ومقاومة عزلات الكلبسيلا الرئوية اتجاه العديد من المضادات الحيوية .
- (3) استخلاص الـ DNA البلازميدي .
- (4) الترحيل الكهربائي لـ DNA البلازميدي على هلام الأجاروز .
- (5) اجراء عملية التحول الوراثي لتحديد ارتباط البلازميد بصفة المقاومة.

الدورات السابقة

1.2 العائلة المعوية Enterobacteriaceae :-

تضم العائلة المعوية أعداد كبيرة من البكتيريا ذات صفات مشتركة مثل تخمر سكر الجلوكوز، عصوية الشكل، سالبة لصبغة جرام، الموطن الطبيعي لها أمعاء الإنسان والحيوان وتتضمن العائلة أجناس مرضية عديدة أهمها: *Salmonella*, *E.coli*, *Shigella*, *Klebsiella*, وغيرها [Brooks et al., 2007].

2.2 بكتريا الكليبيسيلا *K.Pneumonia* :-

ثم عزل هذه البكتريا لأول مرة من قبل العالم " فريد لأندر Friedlander " من إتهاب الرئة في عام 1882 [Podschun and Ullmann.,1998], حيث تنتشر هذه البكتريا بشكل واسع في الطبيعة وتعزل من أماكن مختلفة مثل أجزاء من جسم الإنسان، والحيوان، ومياه الصرف الصحي، والتربة، والمياه العذبة، والمياه المالحة، والبحيرات، وعموما فهي من الممرضات الإنتهازية للإنسان والحيوان [Kumar et al., 2011].



الشكل (1) يوضح بكتيريا *K.Pneumonia*

<https://www.alamy.com/klebsiella-pneumoniae-bacteriacomputer-illustrationkpneumoniae-are-gram-negativeencapsulatednon-motileentericrod-shaped-bacteriathis-species-causes-friedlanders-pneumonia-urinary-tract-infectionskpneumoniae-pathogenicity-can-be-attributed-to-its-production-of-heat-stable-enterotoxinthis-image278492395.html>

1.2.2 تصنيف بكتيريا الكليبيسيلا *K.Pneumonia* :

حيث تصنف بكتيريا الكليبيسيلا إلى:

Kingdom : Bacteria

Phylum : Proteobacteria

Class : Gammaproteobacteria

Order : Enterobacteriales

Family : Enterobacteriaceae

Genus : Klebsiella

Species: *K.Pneumonia*

[Tortora *et al.*, 2004]

وقُسم جنس الكليبيسيلا إلى أنواع اعتمادا على التشابه والاختلاف في الـ DNA منها:-

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

2.2.2 وبائية بكتيريا الكليبيسيلا *Klebsiella of Epidemiology*

هناك ثلاثة طرق للإصابة بـ *K.Pneumonia*،
أما عن طريق التلامس بين المرضى و الأشخاص والبيئة المحيطة بهم،
أو عن طريق الهواء عبر رذاذ المرضى أو عن طريق ابتلاع البكتيريا
مع الأطعمة والمشروبات الملوثة في المستشفى [Doebbeling.,1993].

3.2.2 الإمبراضية *Klebsiella* :-Pathogenicity

الإمبراضية هي قدرة البكتيريا على إحداث المرض , إن الأمراض التي تسببها هذه البكتيريا هي التهاب القناة البولية و القناة التنفسية و جروح العمليات والسحايا وتجرثم الدم وتعفن الدم , وتسبب هذه البكتيريا أيضاً التهاب الأذن الوسطى و التهاب الرئتين . [Damian et al.,2009]

3.2 بكتيريا المستخدمة في التحول الوراثي :-

بكتيريا إيشيريشيا القولون *Escherichia coli* :

وصفت هذه البكتيريا لأول مرة من قبل العالم "Theoder Echerich" عام 1885م في ألمانيا وسميت *Bacterium Coli* وهي معروفة الآن بإسم *Escherichia coli* , تمتاز هذه البكتيريا بكونها عصيات صغيرة الحجم , سالبة لصبغة الجرام , تتحرك بواسطة أسواط محيطية , وقد تمتلك بعض سلالاتها محفظة , غير مكونه للأبواغ , هوائية أو لا هوائية اختيارية , تتوافر هذه البكتيريا بصوره طبيعية في أمعاء الإنسان ولكن عندما تدخل موقعاً غير طبيعي يمكن أن تسبب العديد من الأمراض كـ التهاب المجاري البولية والسحايا لذلك تعد من البكتيريا الانتهازية . [Sharma et al.,2007]

2.3.2 تصنيف بكتيريا إيشيريشيا القولون *E.coli* :

حيث تصنف بكتيريا إيشيريشيا الى :

Domain : Bacteria

Kingdom : Eubacteria

Phylum : Proteobacteria

Class : Gammaproteobacteria

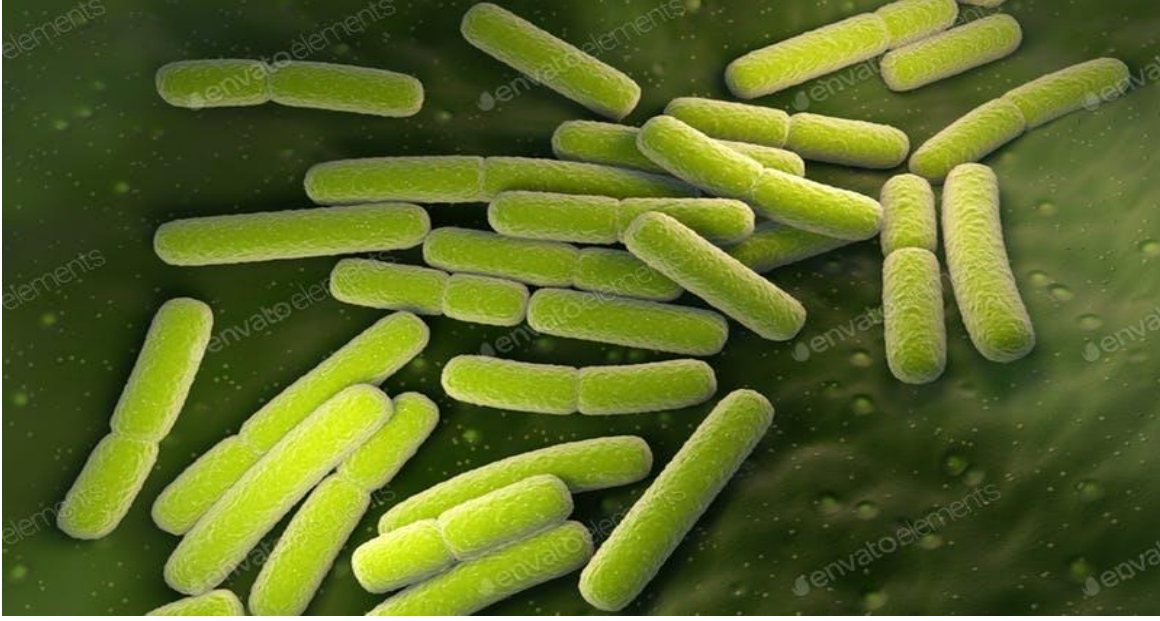
Order : Enterobacteriales

Family : Enterobacteriaceae

Genus : Escherichi

Species : *E.coli*

[Tortora et al., 2004]



الشكل (2) يوضح بكتيريا *E. coli*

<https://elements.envato.com/e-coli-escherichia-coli-bacteria-cells-PC7ZTDA>

4.2 عوامل الضراوة Virulence factor :-

الضراوة Virulence: هي مقياس قدرة البكتيريا على إحداث المرض , إن عوامل الضراوة لدى بكتيريا الكليسيلا هي مستضدات المحفظة ، و Lipopolysaccharides , والبكتيريوسين Bacteriocin , والغشاء الحيوي Biofilm .

1.4.2 مستضدات المحفظة Capsule Antigen :-

تصنع العديد من أنواع البكتيريا كميات كبيرة من مواد خارج الخلية مؤلفة من متعدد السكريد ويطلق عليها مصطلح "Capsule" وهي وحدات متكررة من متعدد السكريد تتكاثف بهيئة طبقة وثيقة الارتباط وتحيط بالخلية البكتيرية [Brooks et al.,2007] .

وتعد المحفظة في بكتيريا الكليسيلا من عوامل الضراوة الأساسية لإحداث الأمراض في الإنسان وتقوم المحفظة بدور أساسي لحماية البكتيريا ضد آلية الجهاز المناعي وذلك بمقاومتها للمتمم [Clements et al.,2008] .

2.4.2 القدرة على الالتصاق Ability of Adhesion:-

تعتمد معظم البكتيريا على قدرتها على الالتصاق بالسطوح المخاطية، وتعد الخطوة الأولى لحدوث الإصابة , وبدون عوامل الالتصاق فإن مسببات الأمراض في البلعوم و الأمعاء والجهاز البولي تجرف قبل أن تسبب في حدوث المرض [Virella.,1997] , إن عامل الضراوة الذي يساعد على الالتصاق هو الهدب الذي يبلغ طوله 10 مايكرومتر وقطره يتراوح بين 1 إلى 11 مايكرومتر, ويكون الهدب أكثر عدداً من الاسواط إذ تبلغ أعدادها من (100 إلى 500) تتوالد من كل خلية ويكون أسمك وأقصر من الاسواط [Greenwood et al.,2007].

3.4.2 الهيمولاييسين البكتريا Bacterial Heamolysin:-

الهيمولاييسين عبارة عن Toxin يقوم بتدمير الغشاء الخلوي لكرات الدم الحمراء مما يؤدي إلى تحللها ويسبب بذلك تجرثم الدم Bacteremia [Liaw et al.,2000]

يصنف الهيمولاييسين إلى ثلاثة أنواع إعتياداً على قابليته لتحلل كرات الدم الحمراء وأحداث الأمراض

النوع الأول - يحلل الأغشية ويطلق على هذا النوع من التحلل بالتحلل الدموي من نوع بيتا β -heamolysin

النوع الثاني - فهو يكون الثقوب في الغشاء الخلوي , وتظهر منطقة ذات لون أخضر حول المستعمرة ويطلق على هذا النوع من التحلل بالتحلل الدموي من نوع الفا α -heamolysin

النوع الثالث - فإنه يحطم جدار الخلية بالطريقة نفسها التي تعمل فيها المنظفات.

وهناك أنواع - لا تظهر تحلل حول المستعمرة توصف بالبكتريا غير محلل لدم Non heamolysin [Gayetz et al.,1982].

4.4.2 أنزيم اليوريز -Urease Enzyme:-

تؤكد الدراسات السابقة على أهمية إنزيم اليوريز بوصفه مسبباً مرضياً وعامل ضراوة للعديد من الأنواع البكتيرية , وينتج من قبل العديد من الأجناس البكتيرية المسببة لخمج المجاري البولية مثل: *Pseudomonas* , *Klebsiella* , *Proteus* . [Ahmed et al.,2003]

تمثل اليوريا المركب النيتروجيني الرئيسي المطروح من جسم الإنسان وكذلك الحيوان , ويعمل إنزيم اليوريز على تحويل اليوريا إلى الأمونيا NH_3 , وحامض الكربونيك H_2CO_3 [Tanaka et al .,2003]

أن بكتريا *K.Pneumonia* لها القابلية على إزالة عنصر الحديد من الجهاز البولي مما يعزز بقائها في بيئة الحامضية وذلك من خلال إنتاجها لإنزيم اليوريز [Maldonado.,2007] .

5.4.2 البكتريوسين Bacteriocin:-

تُعرف البكتريوسينات بأنها مركبات ذات طبيعة بروتينية وتمتلك قابلية لإبادة العديد من أنواع البكتريا أو الحد من نموها [Luders et al.,2003] , لا تعد البكتريوسينات عوامل ضراوة مباشرة وإنما تزيد من إمكانية التنافس لذي السلالات المنتجة .

تدخل هذه البروتينات إلى داخل الخلية عن طريق مستقبلات خاصة وتقوم بعملية القتل عن طريق تكوين قناة ذات نفاذية للأيونات في الغشاء الخلوي , أو تقوم بتقطيع الحامض النووي DNA في أماكن غير مخصصة , أو تثبيط بناء البروتينات عن طريق انشطار الوحدة 16SrRNA أو تثبيط تصنيع طبقة الببتيدو جلايكان في جدار الخلية [Riley.,1998] .

يسمى البكتريوسين المنتج من قبل البكتريا *K.Pneumoniae* بـ "Klepocin" [Riley and Chavan.,2007] , إن تأثير البكتريوسين في الخلية البكتيرية الحساسة قد يكون مثبطاً للنمو , أو قد يكون قاتلاً [Al-charrakh et al.,2011]

تشفر أنتاج البكتريوسينات جينات عدة وتُحمل على بلازميد مكون من جينات من ضمنها ثلاثة جينات أولها - جين أنتاج البكتريوسين Bacteriocin Gene ثم جين يشفر لبروتين المناعة Immunity Gene وذلك لمنع تأثر الخلية بالبكتريوسين المنتج من قبلها , ثم جين التحلل Lysis Gene الذي يشفر لبروتين المحلل يُساعد في عملية تحرر البكتريوسين من الخلية المنتجة [Gillor et al.,2005].

6.4.2 الغشاء الحيوي Biofilm :-

هو تجمع لأحياء مجهرية مع إفرازاتها الخارج خلوية ويكون هذا التجمع بأشكال عدة , إما مع بعضها البعض بهيئة تجمعات , أو أنها تلتصق على سطح ما مثل التصاقها على سطح صخرة أو على سطح الأسنان أو على الأسطح البينية [Donlan and Costerton.,2002]

تتألف الأغشية الحيوية من نوع واحد من الأحياء المجهرية Single Species أو من أنواع عدة Multiple Species , وتختلف الأحياء المجهرية ضمن الغشاء الخلوي مظهرياً عن أفرادها على الرغم من تمثيلها وراثياً .

توجد علاقة وثيقة بين قدرة البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي وقدرتها على إحداث المرض وتسبب حدوث التهاب مزمن , فالبكتيريا المكونة للغشاء الحيوي لها قابلية أكبر على استعمار جسم المريض والإقامة فيه وتصبح أقل حساسية للعلاج بالمضادات الحيوية [Cucarella et al.,2004]

5.2 ارتباط المقاومة ببلازميد الخلية:-

توجد بعض الجينات المقاومة التي تعطي البكتريا خاصية المقاومة للمضادات الحيوية على كروموسوم أو بلازميد الخلية , فبعض هذه الجينات تكون لديها القدرة على الانتقال من بكتريا الى أخرى مما يؤدي إلى انتشار صفة المقاومة , ولتأكيد ذلك أجرى [نجيب ليث مصلح ., سنة 2011] تجربة توضح ارتباط هذه المقاومة ببلازميد الخلية البكتيرية بعد أن قام بتحديد المواقع الوراثية التي تمد العزلات بصفة المقاومة , ومن ثم معاملة البكتريا بدرجات حرارة متفاوتة من (400 إلى 600) ولقترات زمنية مختلفة ثم الكشف على بلازميدات بترحيل الكهربائي

للمادة الوراثية فلوحظ فقدان البلازميدات , وبعد إجراء إختبار الحساسية كانت النتائج فقد البكتيريا قدرتها على المقاومة فالسبب لفقدان العزلات لبلازمياتها يعود إلى أن للحرارة تأثير مباشر على الجدار الخلوي للبكتيريا , وخصوصاً العزلات السالبة لصبغة جرام [نجيب ليث مصلح, 2007] , وأيضاً في دراسة أخرى ل [فرج ديمة نزار, 2010] ذكر فيها أنه عند معاملة بلازميد البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية بمادتي "SDS" وصبغة "Acridin Orange" كانت النتائج فقد البكتيريا قدرتها على المقاومة للمضادات الحيوية منها (البيراسيلين , البنسلين , تتراسايكلين , جنتاميسين) مما يدل على أن صفة المقاومة لهذه مضادات الحيوية محمولة على البلازميد في حين أنه لم تفقد مقاومتها ضد الأمبيسيلين وارتروميسين مما يدل على أن جينات المقاومة لهذه المضادات موجودة على الكروموسوم و من أمثلة الجينات المقاومة الموجودة على البلازميد الخلية والكروموسوم أيضاً هو **rmpA** يدخل هذا الجين في تركيب سكريات المحفظة مما يكسب البكتيريا القدرة على مقاومة عملية البلعمة .

أكتشف هذا الجين في دراسة قام بها [Turton *et al.*,2010] ولوحظ وجود هذا الجين على كل من الأنماط K1,K2 تعتبر هذه الأنماط أحد أنواع *K.Pneumonia* , ثم تشخيص هذه الأنماط عن طريق اختبارات للجينات التي تحملها فوجد أن نمط K1 يحمل جين **maga** والذي يرتبط بصفة فرط اللزوجة المخاطية أم هذه الصفة في نمط K2 مرتبط مع جين **rcaA** والذي يقع على البلازميد حسب ما ورد لـ [Linet *et al.*,2011] كما تحتوي الكليسيلا على جينات أخرى تشفر لعوامل الضراوة الرئيسية منها (**ctrA2 , terA , blactx**) ثم أكتشف هذه الجينات بواسطة تفاعل البلمرة التسلسلي Pcr , كما جاء في دراسة لـ [محمد زينة جاسم واخرون, 2015] ,

اكتشف [Boholl *et al.*,2018] باستخدام طريقة "DDST" (Double Disk Synergy Test) فالجينات المسؤولة عن إنتاج انزيم "MBL" (Metallo β -lactamase) تعرف باسم **IMP1** , **VIM1** فلوحظ وجود تباين بين انتشار هذه الجينات وبين تكون أغشية حيوية قوية في البكتيريا , واكتشف جين آخر يعرف "**NDM**" (New Delhi Metallo) مرتبط ببلازميد

كل من كليبسيلا و ايشرشيا كولاي , يمنح هذا الجين صفة المقاومة لعديد من المضادات حيث ظهر هذا الجين في العينات السريرية في الهند حيث يعمل هذا الجين على انتاج انزيم β -lactamase . الذي يقاوم مضادات البيتا لاکتام [Michael *et al.*,2001].

6.2 المضادات الحيوية Antibiotics :-

تتقسم المضادات الحيوية إلى مضادات قاتلة Bactericidal لها القدرة على قتل البكتيريا وتمنع نموها مجدداً كـ البنسلينات والسيفالوسبورينات ومضادات المجموعة الأمينوجلايكوسيدية ، ومضادات مثبطة لنمو البكتيريا Bacteriostatic التي تعمل على إيقاف تكاثر البكتيريا كـ تتراسيكلين والكلورامفينيكول [Laurence *et al.*,1997].

1.6.2 مضادات البيتا لاکتام:

تعد مضادات البيتا لاکتام من المضادات الأكثر أهمية وذلك لفاعليتها العالية ضد البكتيريا حيث تعمل على جدار الخلية البكتيرية وذلك بتحللها ثم موتها , وتتضمن مضادات البيتا لاکتام : (البنسلينات , السيفالوسبورينات , مجموعة المونوباكتام , الكاربانيم) .

1.1.6.2 البنسلينات Pencillins :-

يمكن تصنيف البنسلينات اعتماداً على السلسلة الجانبية [Mandell *et al.*,1995] إلى :

1.1.1.6.2 بنسلينات محددة الطيف :-

التي تضم بنسلينات طبيعية وبنسلينات ضد المكورات العنقودية

(1) البنسلينات الطبيعية :

وهي تشمل البنسلين G والبنسلين V ويكون الأول حساس للعصارة المعوية، والثاني بمقاومته وثباته فيها .

(2) البنسلينات ضد المكورات العنقودية:

وهي تشمل مجموعة من مضادات الحيوية مثل :
Cloxacillin , Dioloxacillin , Flucloxacillin [Katzung.,2001] .

2.1.1.6.2 بنسلينات واسعة الطيف :-

يطلق عليها البنسلينات الأمينية وهي من مضادات
شبه المصنعة وتشمل كلاً من الامبسيلاين Ampicillin
و الاموكزاسيلين Amoxicillin [Laurence et al.,1997] .

2.6.2 مضادات سيفالوسبورينات Cephalosporins :-

تمتلك السيفالوسبورينات فاعلية أكثر من البنسلينات
ضد البكتريا العسوية السالبة لصبغة الجرام , وتستخدم في حالات الإصابة المتكررة
بالبكتريا وتعمل كبديل للمرضى الذين يعانون الحساسية من البنسلين ,
وتتميز بمقاومتها لأنزيم البنسيليبيز , ولكن ليس
للكائنات المنتجة لأنزيم السيفالوسبورينيز [Atlas.,1995] .

3.6.2 مجموعة المونوبكتام Monobactam :-

تمتلك هذه المجموعة حلقة بيتا لاكتام أحادية
المقاومة لأنزيم β -lactamase ويعد مضاد Aztreonam أول أفراد هذه المجموعة ,
والمرضى الذين لديهم حساسية ضد البنسلين بإمكانهم تحمل مضاد Aztreonam
بدون تفاعلات .

4.6.2 الكاربابنيم Carbapenms :-

تضم مجموعة من المضادات منها Maropenen و Imipenem ,
تمتاز مضادات الكاربابنيم بتأثيرها القاتل على البكتريا ويعد المضاد Imipenem
أول مضاد من هذه المجموعة يمتاز بفعالية عالية ضد البكتريا السالبة لصبغة الجرام .

فيما يتعلق بمقاومة البكتريا لمضادات البيتالاكتام فإنها تمتلك آليات عدة
مثل قلة نفاذية الغشاء الخارجي إذ تحتوي البكتيريا السالبة لصبغة جرام
على بروتينات الغشاء الخارجي المعروفة بالثقوب porins ,

وتلعب هذه الثقوب دوراً بالسماح لمواد معينة من النفاذ خلالها , وتحصل فيها تغيرات عدة مؤدية إلى حدوث انتخاب للمواد المارة إذ يحصل تضيق في أقطار هذه القنوات البروتينية فتحل القنوات الصغيرة محل القنوات الكبيرة, وتعد هذه القنوات الممر الرئيسي لعبور السيفالوسبورينات والبنسلينات و مجموعة الأمينوجلايكوسيدية .

إن فقدان porins من سلالات *K.Pneumonia* المنتجة لأنزيم البيتا لاكتاميز يسبب مقاومة لـ Cefoxitin ويزيد المقاومة للسيفالوسبورينات .

ومن الآليات المهمة الأخرى لمقاومة البكتريا للمضادات الحيوية هو التحوير في موقع الهدف, وهذا يحدث بطريقتين أولهما حدوث طفرة في الجين الذي يعمل على المضاد الهدف , و الأخر هي التحوير الكيمياوي في الأنزيم الذي يعمل عليه المضاد .

تحدث المقاومة لمضادات البيتا لاكتام أيضاً عن طريق أملاك البكتريا أنظمة الدفع وهي عبارة عن بروتينات تنقل مضادات الحيوية من الخلية إلى الخارج , وتكون غشاء خاصاً يساعد الغشاء الداخلي والنسخة البلازميدية على احتجاز المضادات الحيوية وقذفها خارج الخلية البكتيرية , إن هذه الميكانيكية تلعب دور مهم في منح المقاومة لمدى واسع من مضادات الحيوية وخاصةً للبكتريا السالبة لصبغة الجرام [Lambert et al.,2001] .

5.6.2 مجموعة مضادات الامينوجلايكوسيدية Aminoglycosides :-

هي مجموعة من المضادات القاتلة للبكتريا Bactericidal تعمل على تثبيط عملية تصنيع البروتين داخل الخلية البكتيرية لقدرتها على الارتباط مع الوحدة الرايبوسومية الصغيرة (30s) بطريقة تسبب في دخول تسلسلات خاطئة من الأحماض الأمينية مؤدية إلى إنتاج بروتينات غير طبيعية متراكمة داخل الخلية البكتيرية وبالتالي توقف نمو البكتريا [Heritage.,2003] وتضم مجموعة من المضادات منها : Sterptomucim , Neomucin , Kanamycin , Gentamicin وغيرها [المرجاني, 2001] .

6.6.2 الكوينولونات Quinolones :-

تعمل هذه المجموعة على تثبيط تخليق الـ DNA البكتيري عن طريق أعاقه انزيم DNA gyrase إذ تثبط عملية اللف الفائق Super Coiling لشريطي الـ DNA [Hardy et al.,2000] ومن المضادات المهمة التابعة لهذه المجموعة Ofloxacin , Ciprofloxacin .

7.6.2 الكلورامفينيكول Chloramphenicol :-

يعد من المضادات المثبطة لنمو البكتيريا Bacteriostatic إذ يرتبط مع الوحدة الرايبوسومية (50s) فيعمل على تثبيط البروتين وذلك بمنع استطالة السلسلة الببتيدية وتثبط أنزيم Peptidyltransferase وتكون مقاومة البكتيريا للكلورامفينيكول عن طريق إنتاج أنزيم "CATs" (Chloramphenicol Acetyl Transferase) ويشفر لإنتاج هذا الأنزيم بلازميدات منها بلازميد R55 Plasmid الموجود في البكتيريا *K.Pneumonia* [Cloeckaret et al.,2001] .

8.6.2 التتراسايكلين Tetracycline :-

يعد من المضادات الحيوية ذات التأثير المثبط للبكتيريا Bacteriostatic [Fluit et al.,2001] وتعمل هذه المضادات على تثبيط تصنيع البروتين من خلال الارتباط بالوحدة الرايبوسومية الصغيرة (30s) فينتج عن هذا التثبيط منع ارتباط Aminoacyl-tRNA إلى الموقع الخاص بالارتباط على معقد الرايبوسوم mRNA , وان مقاومة البكتيريا لمضاد Tetracycline تقع تحت سيطرة بلازميد إنتقالي [Brooks et al.,2007] .

7.2 مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية :-

تمتلك البكتيريا نوعان من المقاومة :

1) مقاومة طبيعية أو المورثة Natural or Inherent resistance :

مثل مقاومة البكتيريا السالبة لصبغة الجرام لمركب benzyl penicillin بسبب عدم نفاذية جدار الخلية للمضاد [Martindale.,1996] .

(2) المقاومة المكتسبة Acquired resistance :

التي تكتسب بانتقال المادة الوراثية من بكتريا إلى أخرى , وتنتقل بطرق عدة :

أ- **الاقتران Conjugation** : يعد الاقتران البكتيري من أكثر الطرق شيوعاً

لانقال بلازميدات المقاومة و الضراوة وبصورة سريعة بين المجموعات البكتيرية وهو يحدث بمدى واسع بميكانيكيات غير معروفة تماماً [المرجاني., 2011], وخلال هذه العملية تنتقل المادة الوراثية من الخلايا المعطية Donor Cell إلى الخلايا المستلمة Recipient Cell, وتحتوي البلازميدات المنتقلة جينات مقاومة للمضادات الحيوية مما يجعل الخلية البكتيرية المستلمة تفقد حساسيتها للمضادات الحيوية [Guifole et al., 2007].

ب- **التحول Transformation** : تنتقل المعلومات الوراثية من خلال قطعة الـ DNA

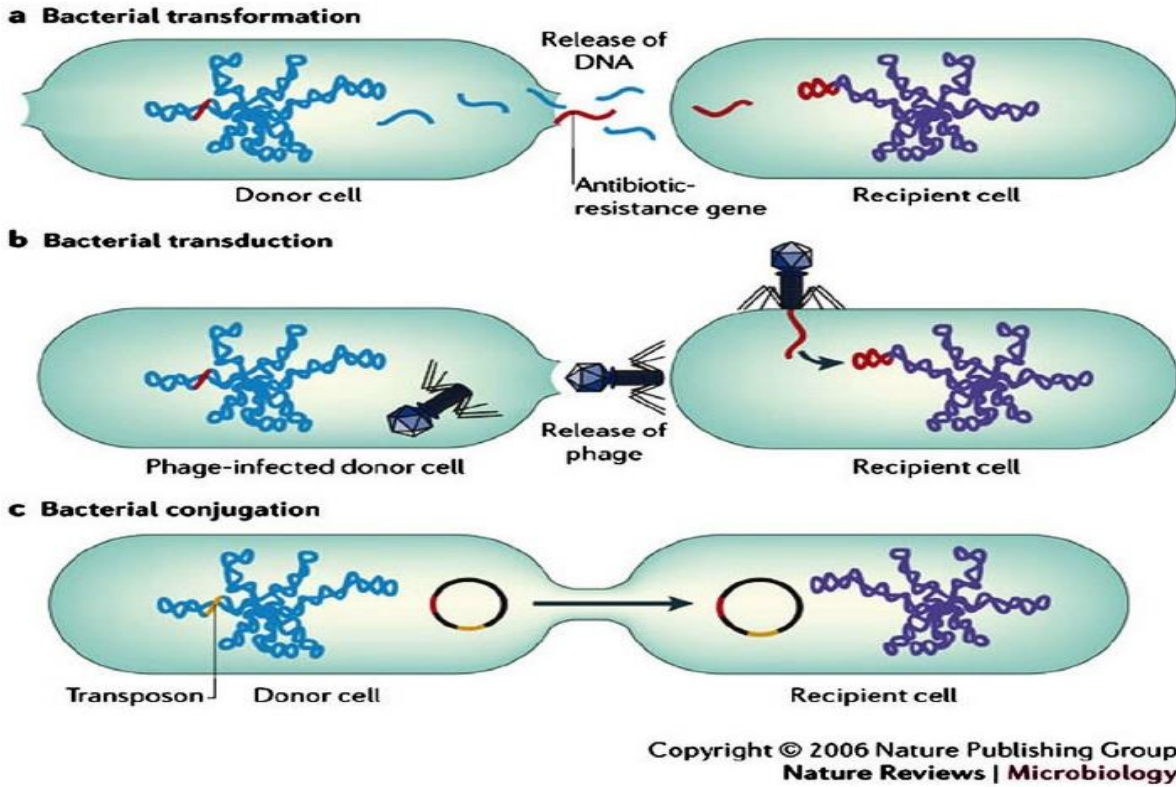
من السلالة المعطية إلى السلالة المستلمة وبالتالي ظهور صفات جديدة تنوارثها الخلايا المستلمة وهو عكس الاقتران لا تحتاج إلى التماس مباشر بين الخلايا المعطية والمستلمة [المرجاني., 2011].

ت- **الفاج Transduction** : وهذه ثالث ميكانيكية ينتقل فيها الـ DNA

بين الخلايا ويكون بواسطة الفاجات Bacteriophages حيث أن معظم الفاجات تحمل المعلومات الوراثية [Greenwood., 2007].

ث- **العناصر الوراثية القافزة Transposable** : هي عناصر جينية لها القدرة

على القفز من موقع إلى موقع آخر للكروموسوم ومن سلالة بكتيرية إلى أخرى وهذه العناصر الجينية غالباً ما تحتوي على جينات المقاومة مضادات الحيوية [Guifole et al., 2007].



شكل (3) يوضح انتقال المادة الوراثية بين الخلايا البكتيرية

8.2 الأنزيمات المثبطة للمضادات الحيوية:-

إن مقاومة البكتيريا لمضادات البيتا لاکتام تشكل مشكلة عالمية كبيرة و إحدى آليات المقاومة هي إنتاج إنزيمات البيتا لاکتاميز وخاصة في العائلة المعوية [Al-Gamy.,2012] , وتسبب المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية لبكتيريا *K.Pneumonia* و أنتاجها لإنزيم البيتا لاکتاميز زيادة نسبة الإصابة المكتسبة في المستشفيات وذلك بسبب انتقالها بواسطة بلازميدات المقاومة .

لقد شخص إنزيم "KPC" (Klebsilla Pneumonia Carbapenemase) أول مرة عام 1996 في شمال ولاية كارولينا ثم أخذ بالانتشار بصورة مثيرة للقلق في نيويورك وعلى طول الشواطئ الشرقية للولايات المتحدة الأمريكية, وإن المعلومات الوراثية لإنزيم "KPC" تقع على البلازميد اقتراني [wendt et al.,2010] , ويمنح إنزيم "KPC" للبكتيريا مقاومة عالية ضد المضادات الحيوية ، وثبت مخبرياً أن المضاد الحيوي الوحيد الذي يمتلك فعالية عالية ضد إنزيم "KPC" هو Polymyxins [Bratu et al.,2005]

9.2 البلازميدات :-

تعرف البلازميدات بأنها عناصر وراثية خارج كروموسومية تمتاز بكونها دائرية وتحتوي على معلومات وراثية تنتقل من خلية إلى أخرى بعدة طرق , وتشفر البلازميدات لمعلومات جينية مختلفة منها المقاومة للمضادات الحيوية , وإنتاج البكتريوسين , وإنتاج السموم وعوامل ضراوة أخرى [Greenwood.,2007] .

يختلف عدد نسخ البلازميدات من خلية إلى أخرى فبعض الخلايا تحتوي على أكثر من 50 نسخة مثل (PBR322), وتعرف ببلازميدات عالية النسخ وبعضها يحتوي على نسخ منفردة كالبلازميد (ptiach) حيث يمثل عدد النسخ عدد جزئيات البلازميد الموجودة في حالة طبيعية في الخلية الواحدة .

تصنف البلازميدات اعتمادا على طبيعة المورثات المحمولة إلى خمسة مجاميع هي :-

اولا :- بلازميدات الخصوبة **F.Plasmids** : بلازميدات التي تحتوي على مورثات التي تساهم في الحصول الاقتران الجنسي في الخلايا البكتيرية .

ثانيا:- بلازميدات المقاومة **R.plasmids** : تحتوي هذه بلازميدات في مادتها الوراثية على مورث واحد أو أكثر لمقاومة المضادات الحيوية.

ثالثا:- بلازميدات الكوليسين **col.plasmids** : تمتلك هذه البلازميدات مورث الكوليسين القادر على إنتاج الكوليسين.

رابعا:- بلازميدات **Degradativeps** : تمتلك هذه البلازميدات مورثات تساعد الخلايا في تمثيل الجزيئات غير الاعتيادية مثل حامض السيليك .

خامسا:- بلازميدات الممرضة **Virulenceps** : وهي بلازميدات التي تسبب الأمراض لخلايا العائل [د.الفصل عبد الحسين 1999] .

المواد وطرق العمل

1.3 المواد :-

1.1.3 الأجهزة والمواد المستعملة :-

استعملت الأجهزة المدرجة في القائمة أدناه.

المصطلح	الجهاز	ت
Incubater	الحاضنة	.1
Water Bath	حمام مائي	.2
Micropipcttes	ماصات دقيقة بأحجام مختلفة	.3
Uv.Transilluminator	مصدر الأشعة فوق البنفسجية	.4
Vortex	رجاج	.5
Centrfuge	جهاز الطارد المركزي	.6
Sensitive balance	ميزان حساس	.7
Refrigerator	ثلاجة	.8
PH.meter	مقياس الأس الهيدروجيني	.9
Gel electrophoresis	جهاز الترحيل الكهربائي	.10
Chaking Incubater	حضانة الهزاز	.11
Digital Camera	كاميرة رقمية	.12
Autoclave	جهاز التعقيم	.13
Electroporation	جهاز الثقب الكهربائي	.14
Laminar Flow Cabinete	كابينة الزرع المجهري	.15

2.1.3 المواد الكيميائية :-

استعملت في هذه الدراسة كلاً من المواد الكيميائية والبيولوجية الآتية :

المصطلح	المادة	ت
Ethanol	الأيثانول	.1
Tris-base	ترس قاعدي	.2
SodiumAsetic	أسيئات الصوديوم	.3
Glucose	جلوكوز	.4
EthylehDiamimTetraAcitisisid	EDTA	.5
Agarose	الأجاروز	.6
NaoH	هيدروكسيد الصوديوم	.7
Hcl	حمض الهيدروكلوريك	.8
Sodium Doducul Sulphate	SDS	.9
Tras- Acetic acid - EDTA	TAE	.10
Etidium bromide	الاتيديومبروميد	.11
Loading Buffer	صبغة التحميل	.12

3.1.3 الأوساط الزراعية المستخدمة :-

استعملت في هذه الدراسة كلاً من الأوساط الزراعية الآتية :

سبب الاستخدام	المصطلح	الوسط	ت
تم استخدامه كوسط انتقائي لزراعة ونمو البكتيريا <i>K.Pneumonia</i>	MacConkey ager	أجار الماكونكي	.1
استخدام هذا الوسط لغرض إجراء اختبار الحساسية للمضادات الحيوية	Muller-Hinton ager	أجار مولر هنتون	.2
استخدام هذا الوسط لغرض زراعة الخلايا البكتيرية أثناء عزل الـDNA البلازميدي والتحول الوراثي	Nutrient broth	وسط المرق المغذي	.3

4.1.3 جدول يتضمن المضادات المستخدمة في اختبار الحساسية

استعملت في هذه الدراسة كلاً من الأوساط الزراعية الآتية :

تركيز المضاد	رمز المضاد	اسم المضاد	المجموعة الوظيفية	ت
(5mg)	P	Penicillin	β-Lactams	.1
(10mg)	AMP	Ampicillin		.2
(30mg)	AMC	Amoxicillin/ Clavulanic Acid		.3
(20mg)	AX	Amoxicillin		.4
(30mg)	E	Erythromycin	Macrolide	.5
(30mg)	CN	Gentamycin	Aminoglycosides	.6
(5mg)	CIP	Ciprofloxacin	Quinolones	.7
(30mg)	NA	Nalidixic Acid		.8
(10mg)	CAZ	Ceftazidium	Cephalosporins	.9
(30mg)	CRO	Ceftriaxone		.10
(10mg)	IPM	Imipenem	Carbapenms	.11
(30mg)	TE	Tetracycline	Tetracycline	.12
(30mg)	C	Chloramphenicol	Chloramphenicol	.13
(300mg)	F	Nitrofuantion	Nitrofuantoin	.14



شكل(4) يوضح جهاز الثقب الكهربائي Electroporation



الشكل (5) يوضح جهاز الأشعة فوق بنفسجية يستخدم في كشف عن أحزمة الـ DNA



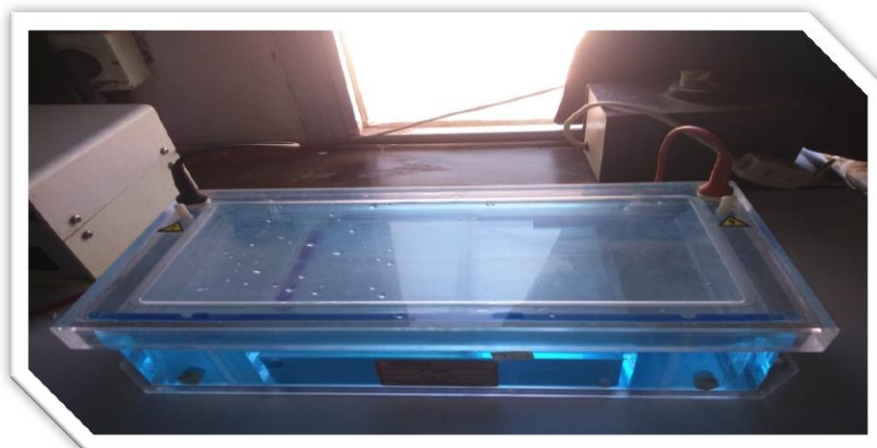
الشكل (6) يوضح غرفة الزرع المجهري تستخدم لزرع الأحياء المجهرية وتحضيرات المختلفة



الشكل (7) يوضح الحاضنه تستخدم في توفير درجات الحرارة الملائمة لنمو الأحياء المجهرية على الأوساط الزراعية



شكل (8) يوضح جهاز الطرد المركزي الذي يستعمل لفصل المواد



الشكل (9) يوضح جهاز الترحيل الكهربائي الذي يستخدم لفصل قطع الأحماض النووي



الشكل (10) يوضح الميزان الحساس (Delicate scales), يستعمل لوزن بعض البيئات أو المواد الكيميائية بدقة عالية



الشكل (11) يوضح حمام مائي (Water Bath). يضبط على درجات حرارية مختلف حسب الغرض المطلوب, ويستعمل في إذابة البينات الصلبة بعد تجمدها.



الشكل (12) يوضح جهاز التعقيم (Autoclave). يستعمل لقتل جميع الكائنات الحية الدقيقة في الأوساط والأدوات المراد تعقيمها.



الشكل (13) يبين حضانة الهزازة يستخدم لنمو الأحياء المجهرية في درجات حرارة محددة وتوفير التهوية الجيدة لها

2.3 طرق العمل :-

1.2.3 تحضير محاليل :

محاليل عزل الـDNA البلازميدي pDNA Isolation Buffer :-

وفقا لما جاء في [Miniatis et al.,2011]

- BufferI -1

يتكون من :-

- I. الجلوكوز (50Mm) Glucose
- II. Tris-cl بتركيز (25Mm) PH(8.0)
- III. EDTA بتركيز (10Mm) PH(8.0)

- BufferII -2

يتكون من :-

- I. NaOH بتركيز (N0.2)
- II. SDS بتركيز 1%

- BufferIII-3

يتكون من :-

M5 من أسيتات الصوديوم يتم معادته باستخدام حمض الخليك الثلجي glacial acetic acid PH(4.5) .

محاليل الترحيل الكهربائي Gel Electrophoresis Solutions :-

وفقا لما جاء في [Miniatis et al.,2011]

- I. محلول TAE للترحيل
- II. 0.025% أزرق برومو فينول bluebromophenol الذي يعرف بـ Loding Buffer والذي يساعد سير العينة على الجل .
- III. 1.5 ميكرو لتر من صبغة الايثيديوم برومايد Etidium bromide تركيزه 5 ملي جرام في 1 ملي لتر.

محاليل التحول الوراثي :-

وفقا لما جاء في [Miniatis *et al.*,2011]

I. جلسرول 10%:

. يتم تحضيره باضافة 5ممل من الجلسيرول إلى 45ممل من Nutrient broth .

II. الوسط المغذي السائل Nutrient broth .

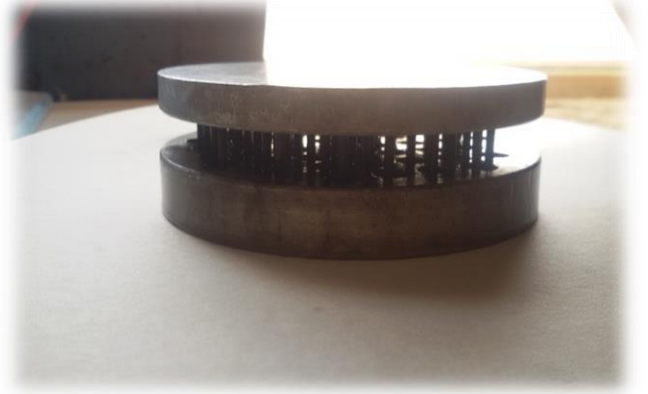
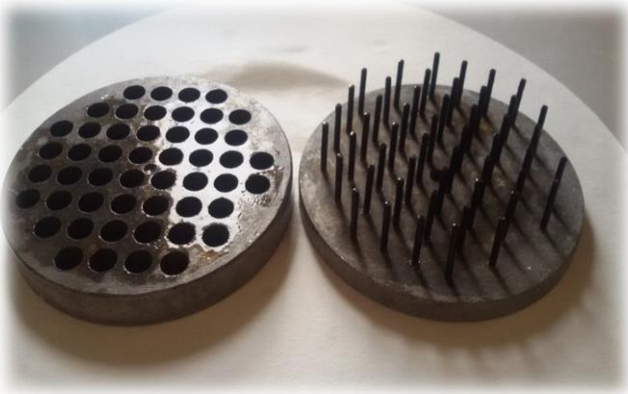
اختبار الارتباط الجيني بطريقة الـ (Replica) :

الأدوات والمواد:

- جهاز النسخ, REPLICA

- عينات البكتيريا: K167 , K193 , *E.coli*

- وسط مغذي سائل Nutrient broth .



شكل (14) يوضح أداة النسخ الكلوني.

2.2.3 جمع العينات samples collection :-

تم الحصول على 8 عزلات غير متكررة لبكتيريا *K.Pneumonia* والتي تحمل الأرقام (K188,K165,K122,K167,K148,K193,K195,K41) من المتحف الميكروبي بالمختبر المركزي بمستشفى سبها الطبي بدولة ليبيا في فتره ما بين 2015-2017.

3.2.3 تنمية عينات البكتريا **GROWTH OF BACTERIALSAMPLE**:-

تم تنمية عزلات الكليبيسيلا في وسط Nutrient broth عن طريق أخذ جزء من العينة المحفوظة بواسطة اللوب وزرعها في الوسط Nutrient broth وتم التحضين لمدة 18 إلى 24 ساعة في درجة حرارة 37^0 . تم بعد ذلك زراعتها على الأطباق التي تحتوي على وسط Macconky agar الخاص بالزراعة التفريقية والانتقائية للجراثيم المعوية ومنها جراثيم الكليبيسيلا الرئوية ومن ثم حضنت الأطباق بشكل مقلوب في الحضانة الهوائية على درجة حرارة 37^0 لمدة 18 إلى 20 ساعة.

نلاحظ نمو مستعمرات كثيفة وردية اللون لامعة ذات قوام لزج كما هو موضح بالشكل التالي.



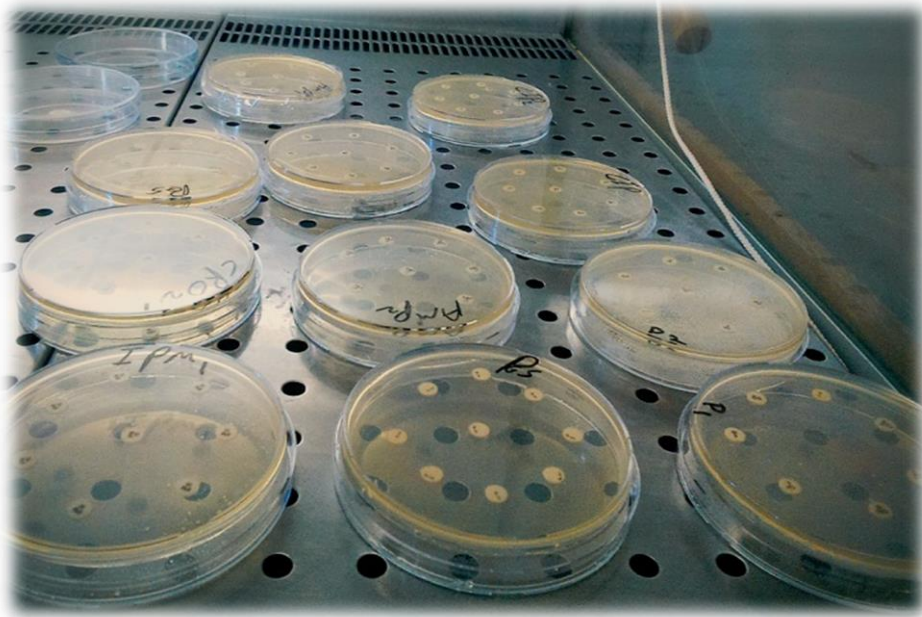
شكل (15) يوضح بكتيريا الكليبيسيلا الرئوية على وسط مكوني الصلب.

<https://microbeonline.com/macconkey-agar-mac-composition-preparation-uses-/and-colony-characteristics>

4.2.3 اختبار الحساسية للمضادات الحيوية Anitibiotic Susceptibility Test :-

استخدمت طريقة انتشار القرصي بحسب (Kirby Bauer Method) القياسية , حيث تم أخذ مستعمره من البكتيريا *K.Pneumonia* ووضعها في ماء معقم أو محلول ملحي (Normal sline) تم زراعتها على وسط (Mueller Hinton agar) بطريقة الفرش مع مراعاة تدوير الطبق في ثلاثة اتجاهات مختلفة بهدف توزيع الجراثيم بشكل متجانس على سطح الطبق , ومن ثم وضع أقراص المضادات الحيوية على سطح وسط التحسس بواسطة ملقط معقم بمعدل 7 إلى 8 أقراص في كل طبق , وحضنت الأطباق في الحضانة الهوائية بدرجة 37^0 لمدة 24 ساعة , بعد التحضين قيست أقطار هالات التثبيط النمو الجرثومي حول كل قرص , باستخدام مسطر مدرجة بالمليمتر , حيث عدة الجراثيم الحساسة S , ومتوسطة الحساسية I , والمقاومة R بمقارنة قطر التثبيط مع الجداول القياسية العالمية بحسب معايير المعهد العالمي للنتائج القياسية للمخابر السريرية (CLSI) .

. The Clinical And Laboratory Standards Institute



الشكل (16) يوضح أطباق تحتوي على المضادات الحيوية.

مضادات الحيوية المستخدمة وأقطار منطقة التثبيط القياسية (CLSI)

Sensitive (S)	Intermediate (I)	Resistant (R)	رمز المضاد وتركيزه
15≤	27-20	≥14	P(5 _{μg})
15≤	12-14	≥11	AMP(10 _{μg})
18≤	14-17	≥13	AX(20 _{μg})
17≤	15-16	≥14	AMC (30 _{μg})
23≤	22-14	≥13	E(30 _{μg})
15≤	13-14	≥12	CN(30 _{μg})
31≤	21-30	≥20	CIP(5 _{μg})
21≤	-----	≥20	Caz(10 _{μg})
23≤	20-22	≥19	CRO(30 _{μg})
23≤	20-22	≥19	IPM(10 _{μg})
19≤	14-18	≥13	NA(30 _{μg})
15≤	11-13	≥10	TE(30 _{μg})
18≤	13-17	≥12	C(30 _{μg})
17≤	15-16	≥14	F(300 _{μg})

5.2.3 استخلاص الـ DNA البلازميدي Extractron DNA Plasmid :-

اتبعنا طريقة التحلل القلوي (alkaline lysis) كما جاء في [Miniatis.,2001] لعزل الـ DNA البلازميدي من بكتريا الكليسيلا المستخدمة في الدراسة وفقا لتعديلات التالية:-

- 1- تم تنشيط البكتيريا على وسط MacConkey للحصول على مستعمرات منفصلة وتحضن لمدة 24 ساعة في درجة حرارة 37⁰.

- 2- نقل مستعمرة بكتيرية الى 5 مليا لتر من وسط Nutrient Broth وينقل بعد ذلك إلى حضانة الهزازة لمدة 19-20 ساعة في درجة حرارة 37^0 .
- 3- نقل 1.5 مليا لتر من المزرعة البكتيرية إلى أنبوبة أبنودولف , ثم ترسيب المعلق البكتريا باستخدام جهاز الطرد المركزي على سرعة 14000 دورة لمدة 5 دقائق.
- 4- تم التخلص من الطافي وإعادة الترسيب البكتريا مرة أخرى بحيث يصبح حجم المحلول 3 مليا لتر لغرض مضاعفة كمية الخلايا .
- 5- أضيف على الراسب 1 مليا لتر محلول ملحي Normal Cline وتحريك الأنابيب قليلاً لغرض غسل الخلايا , ثم التخلص من الطافي بوضع الأنابيب مقلوبة على أوراق ترشيح لكي يتم التأكد من جفاف الراسب .
- 6- أضيف 100 ميكرو لتر من Buffer I , ومزج الخليط عن طريق قلب الأنبوبة 6 مرات ووضعها في الحضانة عند درجة حرارة 37^0 لمدة نصف ساعة .
- 7- أضيف 200 ميكرو لتر من Buffer II , ثم وضع العينات في حمام تلجي لمدة 5 دقائق يلاحظ تحول المحلول للون الشفاف .
- 8- أضيف 150 ميكرو لتر من Buffer III , ثم يتم تقليب الأنابيب بحرص لأعلى وإلى الأسفل لمزج خليط جيداً , يلاحظ تكون مزيج يشبه اللبن الرائب , ثم تحضن الأنابيب في تلج مجروش لمدة 5 دقائق .
- 9- يتم عمل طرد مركزي لمدة 20 دقيقة على سرعة 14000 دورة في الدقيقة ((يتكون راسب ابيض من حطام الخلايا)) .
- 10- يتم نقل السائل الطافي ويوضع في أنبوبة أبنودولف جديدة , ويضاف إلى السائل ضعف الحجم من الإيثانول تركيزه 96% وتوضع لأنابيب في المجمد لمدة 24 ساعة .
- 11- في اليوم التالي يجري طرد مركزي لترسيب العينات لمدة 10 دقائق على سرعة 14000 دورة في الدقيقة يتكون راسب ابيض من الـ DNA ثم يتم التخلص من سائل الطافي . وتوضع الأنابيب مقلوبة على ورق ترشيح لتجف .

12- تم إضافة 1 مل من الايثانول تركيز 70% تقلب الأنبوب قليلاً
تم ترسب العينات وتخلص من الطافي جيداً وتوضع الأنبوب
مقلوبة على ورق الترشيح لتخلص من بقايا الإيثانول ،
تتم هذه الخطوة لغرض غسل الخلايا .

13- تم ذويب الراسب في 50 ميكرو لتر من الماء المقطر المعقم
وتتم هذه العملية بلطف لغرض تجنب تكسر DNA ،
ثم نغلق أنبوبة الأندورف الصغيرة بأحكام وحفظها في المجمد ،
وقد أصبح جاهزاً للترحيل الكهربائي .

6.2.3 الترحيل الكهربائي لـ DNA في هلام الأجاروز Gel Electrophoresis :-

تستخدم هذه الطريقة للكشف عن وجود الـ DNA البلازميدي
من عدمه فتم استخدام جل الأجاروز وجهاز الترحيل الكهربائي electrophoresis
كما جاء في [Miniatis.,2001] وفقاً لتعديلات التالية:-

- 1- تم إذابة 0.8g من الأجاروز في 100 مليلتر من محلول TAE
وترك الهلام ليبرد لتصل حرارته 50^0 .
- 2- حضر قالب صب الهلام وذلك بإحاطة حافتي القالب بالشريط اللاصق
وتثبيت مشط لتكوين الحفر ، ثم صب الهلام داخل القالب
وتركه ليتصلب لمدة 30 دقيقة وفيما بعد رفع المشط والشريط اللاصق
برفق ووضع القالب داخل حوض الترحيل الكهربائي
المحتوي على محلول TAE بحيث يغمر هلام الأجاروز .
- 3- أجريت عملية تحميل عينات الـ DNA في حفر الهلام
بعد مزج 16 ميكرو لتر من محلول الـ DNA مع 4 ميكرو لتر
من (برومو فينول + الايثيديوم برومايد) .
- 4- رحلت كهربائياً تحت فرق جهد 90 فولت وبمعدل مرور للتيار 89 ملي أمبير
لمدة 3 ساعات .
- 5- تم فحص الهلام بواسطة جهاز Uv.Transilluminator
بطول موجي مقداره (312) نانو ميتر ثم تصويره بواسطة الكاميره .

7.2.3 التحول الوراثي:-

اتبعت طريقة التحول الوراثي كما جاء في [Miniatis.,2001] لتحضير الخلايا المستلمة *E.coli* والتحول الوراثي لها باستخدام الـ DNA البلازميدي معزول من بكتيريا *K.Pneumonia* (K167,K193) باستخدام جهاز الثقب الكهربائي، وفقاً لتعديلات التالية:-

- 1- تم تنمية بكتيريا *E.coli* المراد إجراء التحول الوراثي لها على وسط صلب لغرض الحصول على مستعمرات منفصلة، وتحضينها عند درجة حرارة 37^0 لمدة 24 ساعة.
- 2- أخذ مستعمرة منفصلة من المستنبت البكتيري وزرعها في 5 مل من وسط NB لمدة 3 ساعات في حضانة الهزازة في درجة حرارة 37^0 .
- 3- تم توزيع المعلق البكتيري المتكون على 5 أنابيب إندولف بحيث يكون 1000 مايكرو لتر في كل أنبوب .
- 4- ثم بعد ذلك ترسيب الخلايا بواسطة جهاز الطرد المركزي لمدة 5 دقائق على سرعه 5000 دورة في الدقيقة.
- 5- إذابة الخلايا في 500 مايكرو لتر من محلول Normal Slain وذلك بغرض غسل الخلايا ومن ثم إجراء الطرد المركزي على قوة 5000 دورة في الدقيقة لمدة 5 دقائق.
- 6- تم إعادة الخطوة السابقة ولكن دون ترسيب الخلايا .
- 7- إضافة 50 مايكرو لتر من 10% جليسيرول (ذكر تحضيره مسبقاً) وتذويب الخلايا بالماصة حتى يتكون معلق.
- 8- أخذ حوالي 50 مايكرو لتر من معلق الخلايا ثم أضيف له 1 مايكرو لتر من (pDNA) من العينة *K193,K167* نظراً لمقاومة هذه العزلات لمعظم المضادات الحيوية.
- 9- تترك أحد الأنابيب بدون (pDNA) كالمشاهد على حدوث عملية التحول.

****ملاحظه:-** تعامل العينة التي لم يتم إضافة الـ (pDNA) لها بنفس الظروف التي تعامل بها الخلايا المضاف إليها (pDNA).

- 10- ثم إضافة 50 مايكرو لتر من كل عينة إلى أنبوبة الثقب الكهربى المعقمة .
- 11- تم وضع الأنبوبة في المجال المخصص لها مع التأكد من أن جهاز مفصول عن الكهرباء قبل وضع العينة .
- 12- تم تعديل جهد على 1800 فولت تم عمل صعقه كهربائية لكل عينة .
- 13- تم إضافة 100 مايكرو لتر من NB ومزج العينات قليلا .
- 14- ثم سحب المحلول ووضعها في أنابيب معقمة كل عينة في الأنبوب المخصص لها .
- 15- ثم وضع الأنابيب في حضانة الهزازة لمدة ساعة على درجة 37⁰ .
- 16- بعد انقضاء الوقت المحدد ثم أخذ 50 مايكرو لتر من المعلق ووضعها على الأطباق التي تحتوي على مضاد حيوية (CIP 5mg , CRO 30mg , CN 30mg) بحيث يكون لكل مضاد طبقين أحدهما توضع فيه العينة الشاهد ((CONTROL)) والآخر وضعت فيه العينة التي تم إجراء التحول الوراثي لها .
- 17- تحضن الأطباق بشكل مقلوب في الحضانة لمدة 24 ساعة على درجة حرارة 37⁰
- **ملاحظه يتم زراعة البكتيريا على طبق لا يحتوي على مضادات بغرض تحقق من نمو البكتيريا.**

8.2.3 اختبار النسخ الكلوني REPLICA (الارتباط الجيني Gene Linkage):

الجهاز المستخدم عبارة عن أداة مكونة من قاعدة تحتوي على 52 فتحة وغطاء يحتوي على 52 مشط ملائم لفتحات القاعدة, يتم تعقيمه بالكحول والحرارة لأنه مصنوع من مادة معدنية.

1. حيث يتم وضع NB وسط سائل مغذي في فتحات قاعدة REPLICA .
2. يتم وضع السلالة المستقبلة لـ DNA قبل عملية التحول الوراثي *E.coli* +NB في فتحات أحد الأطراف , وتعتبر هذه السلالة ككترول للمقاومة والحساسية للمضادات الحيوية .

3. يتم توزيع العينات الـ *E.coli* المتحولة وراثياً في باقي الفتحات .
4. ثم يتم تحضير أطباق بتري تحتوي على وسط صلب Muller-Hinton ager , مضافاً له أقراص المضادات الحيوية بحيث يكون لكل مضاد طبق (CIP 5mg , CRO 30 mg ,CN 30mg) .
5. يتم وضع الغطاء المحتوي على أمشاط على فتحات القاعدة , ثم وضعها على وسط صلب Muller-Hinton ager , بدون الضغط عليها , ولكن بثقله فقط .
6. توضع الأطباق في الحضانة الهوائية لمدة 24 ساعة في درجة حرارة 37⁰ .
7. يتم تسجيل النتائج في اليوم التالي .

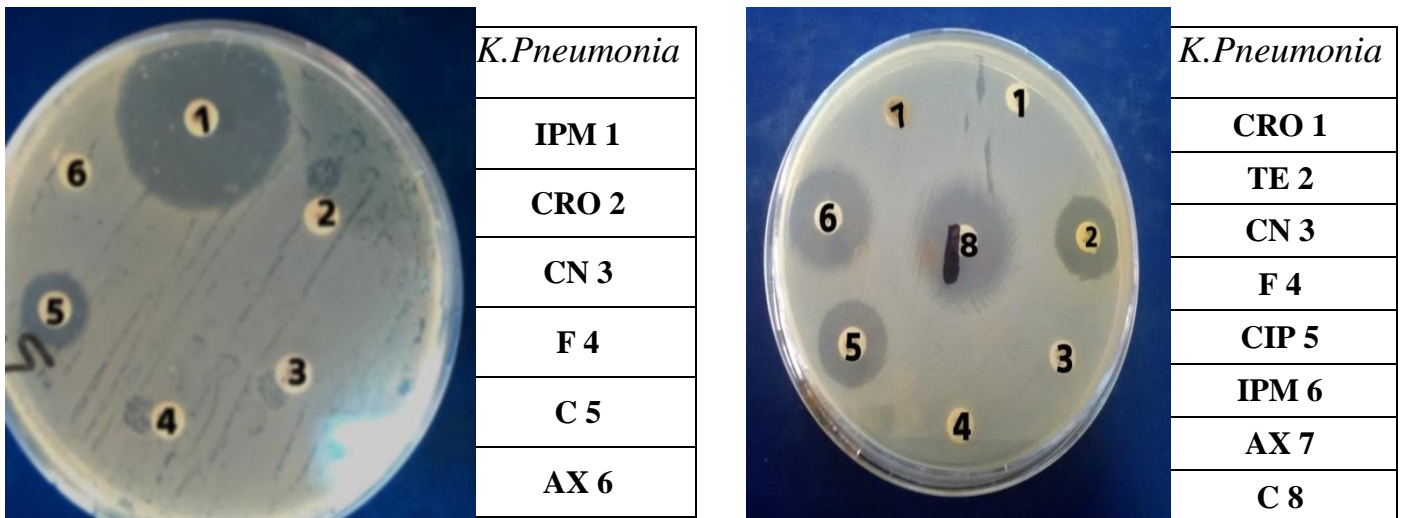
النتائج

1.4 نتائج اختبار الحساسية:-

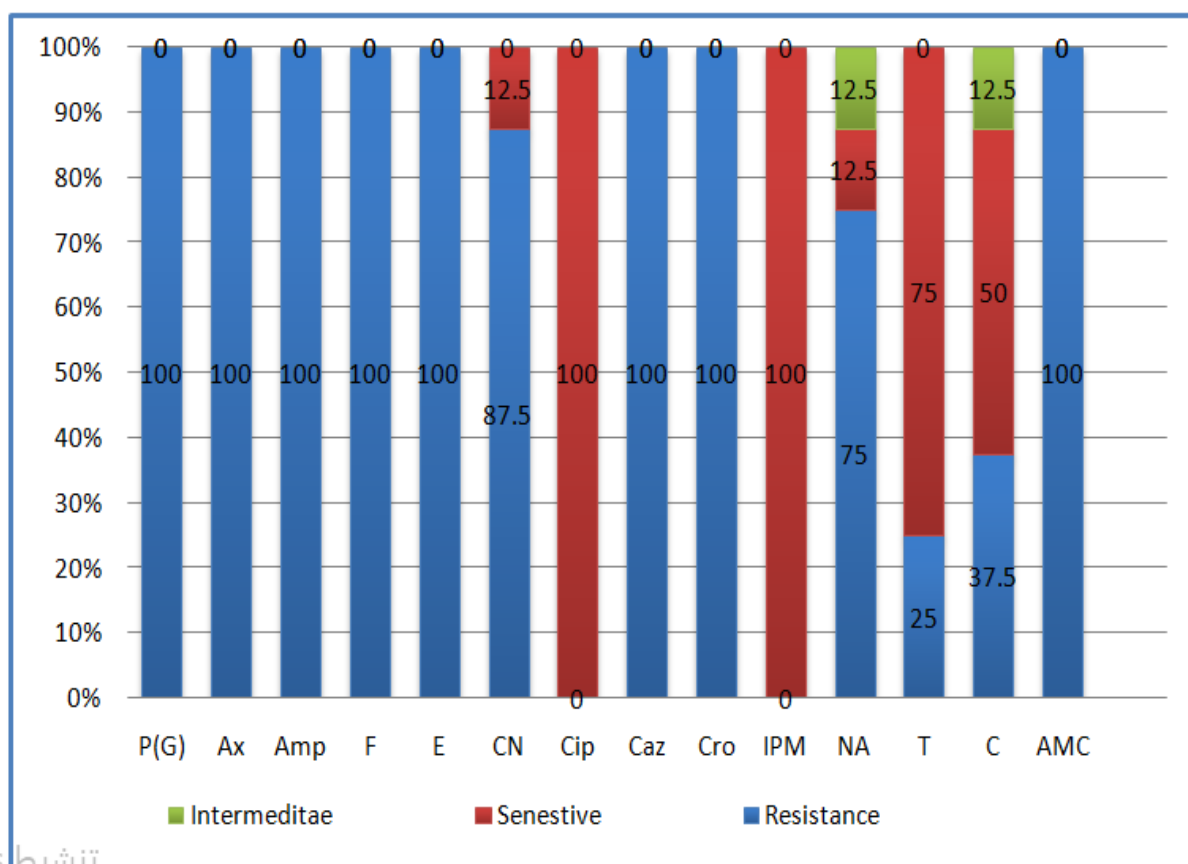
حددت مقاومة العزلات قيد الدراسة إتجاه مجموعة من مضادات البيتا لاکتام (Amoxicillin , Amoxicillin/ Clavulanic Acid , Ampicillin , Penicillin), السيفالوسبورينات (Ceftriaxone,Ceftazidime) , والكاربامبنيم (Imipenem) , و الأمينوجلايكوسايدات (Gentamicin) , و الماكروليد (Erythromycin) , والكوينولونونات (Nalidixic,Ciprofloxacin) , و التتراسايكلين (Tetracycline) , و الكلورامفينيكول (Chloramphenicol) .

واعتمادا على قياس قطر منطقة التثبيط وعلى الطريقة المبينة في (CLSI) حيث أظهرت جميع العزلات قيد الدراسة وكما هو مبين في الجدول والشكلين (17,18) مقاومة كاملة للمضادات (Amoxicillin ,Amoxicillin/ ClavulanicAcid , Penicillin) بنسبة 100% , وكانت المقاومة للمضادات الحيوية (Nitrfurantion,Ceftriaxon,Ampicillin, Ceftazidime , Erythromycin) بنسبة 87.5% و 75% على التوالي , وبلغت المقاومة للمضادات الحيوية (Tetracycline , Chloramphenicol) بنسبة 37.5% و 25% على التوالي.

بينما أظهرت جميع العزلات حساسية بنسبة 100 % لهاذين المضادين الحيويين (Ciprofloxacin , Imipenem) كما هو مبين في الشكل التالي .



الشكل (17) يبين نتائج اختبار المضادات الحيوية لعزلات *K.Pneumonia* .



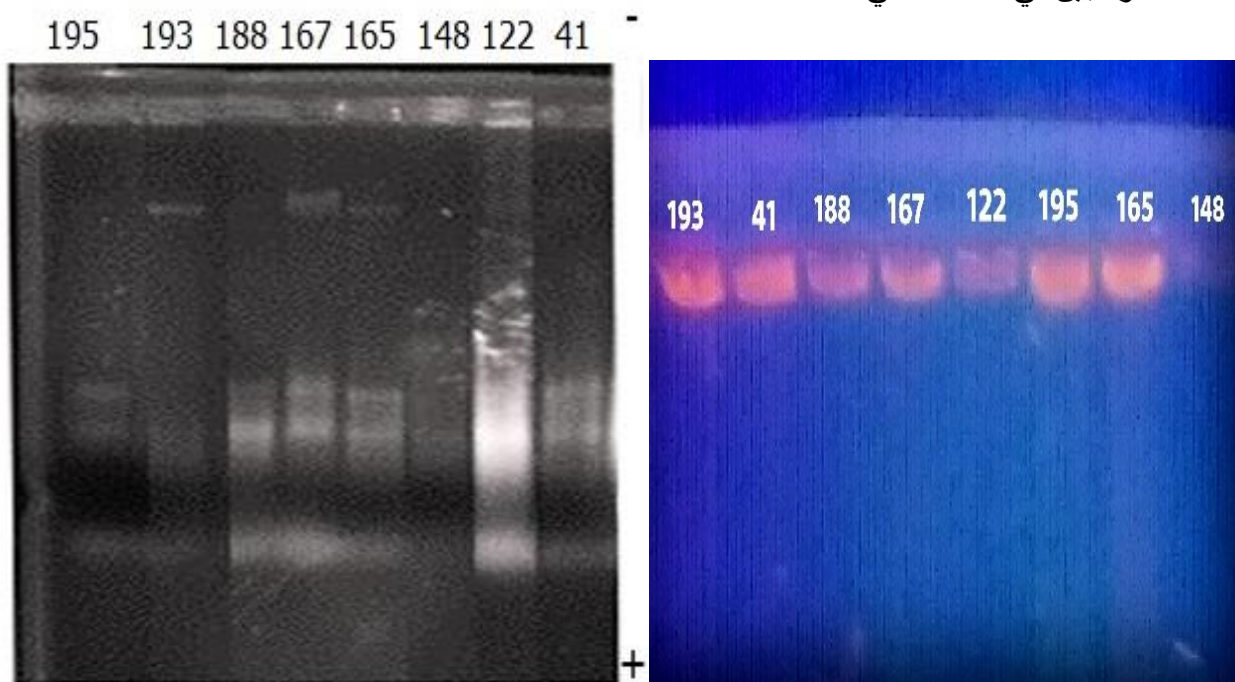
شكل (18) .. النسبة المئوية المنوية لمقاومة بكتريا *K.Pneumoniae* للمضادات الحيوية المختلفة

جدول يبين الأنماط المظهرية للكليبسيلا الرئوية ذات المقاومة المتعددة

Strain	CAZ	CRO	CIP	CN	C	IPM	E	TE	NA	F	AMP	P	AX	AMC
K193	R	R	S	R	S	S	R	S	S	R	R	R	R	R
K195	R	R	S	R	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R
K122	R	R	S	R	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R
K167	R	R	S	R	S	S	R	S	S	R	R	R	R	R
K41	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R
K148	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R
K165	R	R	S	R	I	S	R	R	I	R	R	R	R	R
K188	R	R	S	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R	R

2.4 نتائج استخلاص الـ DNA البلازميدي :-

تم التحري عن المحتوى البلازميدي للعزلات قيد الدراسة , وكانت النتائج الاستخلاص ظهور جزيئ الـ DNA البلازميدي في كل العزلات كما هو مبين في الشكل الآتي:



شكل (19) يبين نتائج استخلاص جزيئ الـ DNA البلازميدي لبكتريا الكليبيسيلا

حيث احتوت عينة K148 على حزام بلازميدي واحد , بينما أظهرت عينة K195 على حزامين بلازميديين ويتعادل ذلك مع العينات K193, K188, K41 واحتواء عينة K167 على ثلاثة حزم بلازميدية ويتعادل ذلك مع عينة K165 , بالإضافة إلى بلازميدات كبيرة (Mega plasmid) شائعة في كل العزلات.

3.4 نتائج التحول الوراثي :-

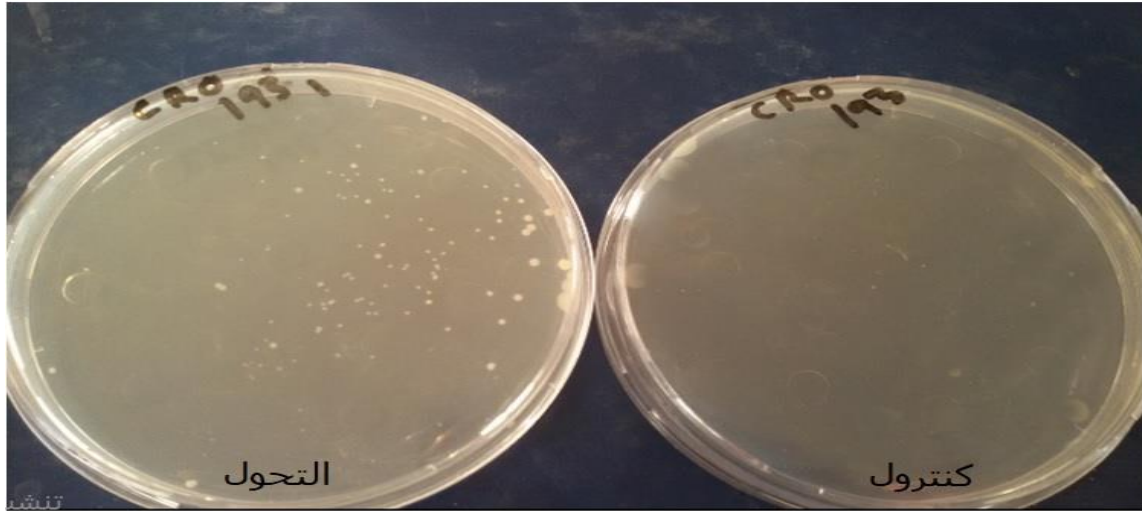
ثم إجراء التحول الوراثي بواسطة الـ DNA البلازميدي المعزول من الخلايا التي تحمل صفة المقاومة للمضادات الحيوية وهي *K.Pneumoniae* (K193, K167) , وثم استخدام خلايا *E.coli* الحساسة للمضادات الحيوية (CIP5_{mg}, CRO30_{mg}, CN30_{mg}) كخلايا مستقبلة كما في الشكل التالي :



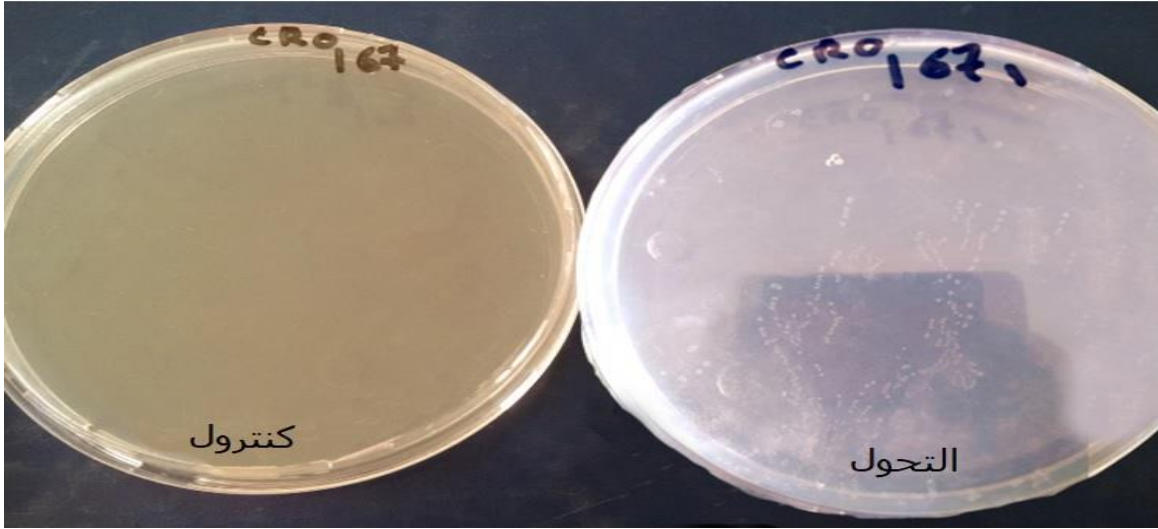
<i>E.coli</i>
F-1
CRO-2
CN-3
CIP-4

شكل (20) يبين نتائج إختبار الحساسية لبكتريا *E.coli*

النتائج المبينة في الشكلين (21,22) يوضح أكتساب خلايا *E.coli* المستخدمة كخلايا مستقبلة لخاصية المقاومة للمضاد الحيوي CRO من كل من العينتين (K193, K167)

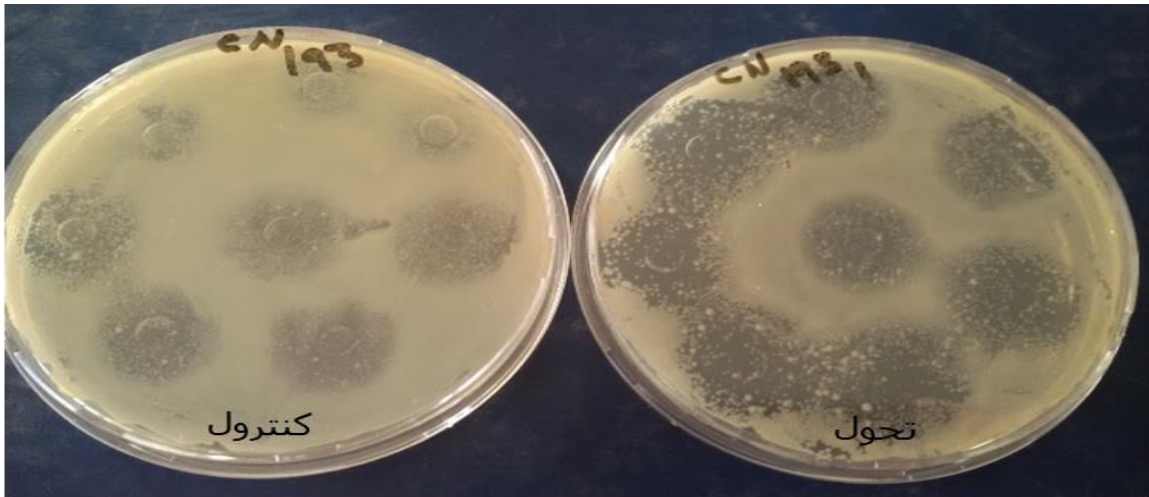


شكل (21) يبين نتائج التحول الوراثي لخلايا *E.coli* المعاملة بواسطة الـ DNA البلازميدي مقارنة بالكنترول لعينة 193 على طبق يحتوي مضاد CRO

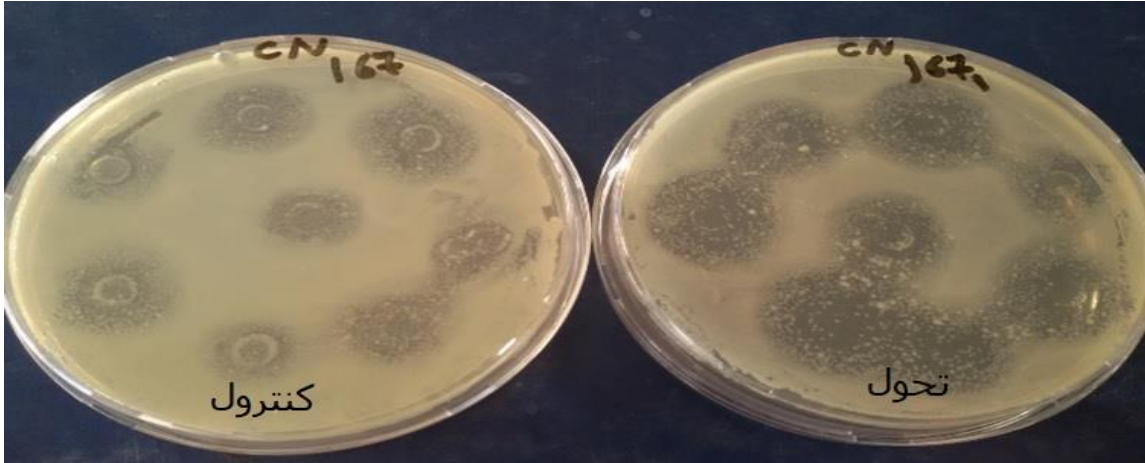


شكل (22) يبين نتائج التحول الوراثي لخلايا *E.coli* المعاملة بواسطة الـ DNA البلازميدي مقارنةً بالكنترول لعينة 167 على طبق يحتوي مضاد CRO

وكانت النتائج المبينة في الشكلين (23,24) تبين زيادة حساسية خلايا *E.coli* المحولة للمضاد الحيوي CN مقارنةً بالكنترول من كل من العينتين (K193, K167)



شكل (23) يبين نتائج التحول الوراثي لخلايا *E.coli* المعاملة بواسطة الـ DNA البلازميدي مقارنةً بالكنترول لعينة 193 على طبق يحتوي مضاد CN

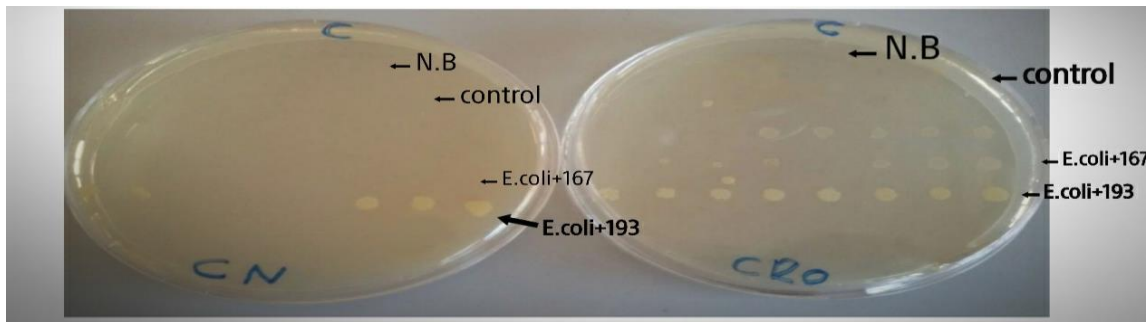


شكل (24) يبين نتائج التحول الوراثي لخلايا *E.coli* المعاملة بواسطة الـ DNA البلازميدي مقارنة بالكنترول لعينة 167 على طبق يحتوي مضاد CN

5.4 نتائج الارتباط الجيني:-

تم بحث ارتباط مقاومة خلايا *E.coli* المحولة بواسطة بلازميد العزلات *K193, K167* وذلك بهدف تحديد ارتباط تموضع جينات المقاومة لكل من المضادين الحيويين (CRO, CN) على هذه البلازميدات , ثم زراعة خلايا *E.coli* المكتسبة لصفة المقاومة للمضادين الحيويين (CRO, CN) , على طبق يحتوي على المضاد الحيوي CRO والأخر على المضاد الحيوي CN .

النتائج المبينة في الشكل (25) توضح أن نسبة 50% من خلايا *E.coli* المحولة بواسطة بلازميد *K193* قد ارتبطت مقاومتها بالمضاد الحيوي CRO بمقاومتها للمضاد الحيوي CN , في حين أن الخلايا *E.coli* المحولة بواسطة البلازميد *K167* لم يكن نموها على المضاد الحيوي CRO مرتبطاً بأي مظهر من مظاهر المقاومة للمضادات الحيوية الأخرى .



شكل (25) يبين نتائج ارتباط الجيني

النتائج

5 المناقشة :-

أظهرت النتائج أن *K.Pneumonia* تمتاز باكتساب جينات المقاومة للمضادات الحيوية المتعددة فكانت نسبة المقاومة , للمضادات الحيوية (Amoxicillin ,Amoxicillin/ Clavulanic Acid , Penicillin), (Nitrfurantion,Ceftriaxon,Ampicillin, Ceftazidime , Erythromycin) بنسبة 100% , وتتفق هذه النتائج مع ما جاء في [خفاجي., 2008] و [فرج ديمة., 2010] كما أن هذه العزلات ذات حساسية للمضاد الحيوي (Imipenem) بنسبة 100% , وتتفق هذه النتائج مع ما جاء في [Benenson et al.,2011] .

هذه النتائج متوقعة بسبب الاستعمال الواسع أو العشوائي للمضادات الحيوية مما ينتج سلالات مقاومة للمضادات الحيوية , وتنشئ سلالات مقاومة للمضادات الحيوية بعدة طرق إما نشوء طفرات أو أحتوائها على جينات المقاومة الذاتية أو اكتسابها عوامل مقاومة من أجناس بكتيرية أخرى عبر طرق انتقال المادة الوراثية [Bratu et al.,2005] .

بهدف البحث أي من هذه الاحتمالات يعود إليها السبب في تمتع هذه العزلات بالمقاومة للمضادات الحيوية ثم الكشف عن محتوى هذه العزلات لوجود الكروموسومات الإضافية فيها وقد كشفت النتائج أن جميع هذه العزلات تحتوي على كروموسومات إضافية و Mega Plasmid والتي من المرجح أن يعود إليها السبب في المقاومة لأي من المضادات الحيوية التي تم دراستها وتتفق هذه النتائج مع ما جاء في [Wel et al.,2005] و [AL.Chairakn et al.,2011] .

لتحري علاقة هذا المحتوى البلازميدي بأي من مظاهر المقاومة تم انتخاب المحتوى البلازميدي لعزلتين *K167* و *K193* لإجراء التحول الوراثي , وأظهرت نتائج التحول الوراثي مع الخلايا *E.coli* الحساسة للمضادين الحيويين CRO و CN , ارتباط المقاومة للمضاد الحيوي

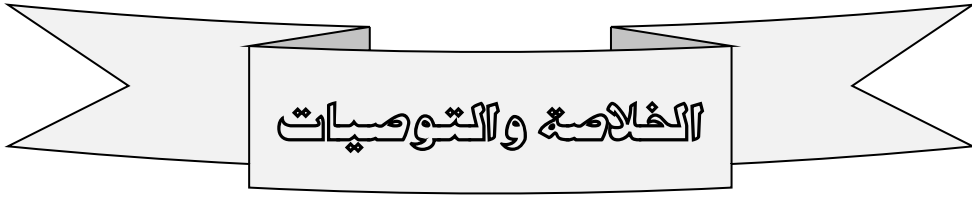
CRO بالمحتوى البلازميدي لكل من هاتين العزلتين *K167* و *K193* , مما يشير إلى ارتباط جين المقاومة للمضاد الحيوي CRO ببلازميد العزلتين *K167* و *K193* .

توافق نقل صفة المقاومة للمضاد الحيوي CRO لعزلتين *K167* و *K193* قد يعني أن المحتوى البلازميد واحد لكل من العزلتين .

لقبور هذه الفرضية أو رفضها تم البحث في ارتباط الـ *E.coli* المتحولة المقاومة للمضاد CRO بالمضاد الحيوي CN , وبينت أن نسبة 50% من الخلايا المتحولة قد اكتسبت المقاومة للمضاد الحيوي CRO علاوة على المضاد الحيوي CN في عينة *K193* , في حين لم يتزامن اكتساب المقاومة للمضاد الحيوي CN بأي من مظاهر المقاومة للمضادات الحيوية الأخرى في عينة *K167* .

هذه النتائج تشير إلى عدم تشابه كلاً من بلازميدات العزلات *K167* و *K193* من حيث المحتوى الوراثي , كما تشير إلى أن مقاومة المضاد الحيوي CRO لا تبعدو مرتبطة بالمضاد الحيوي CN ففي عزله *K167* , هذه النتائج تبدو أولية وتتطلب المزيد من التحليل الوراثي على المستوى الجزيئي.

وبالعودة إلى نتائج الهجرة الكهربائية بمحتوى البلازميدي لكل من العزلتين *K193* و *K167* تُبين عدم تطابق الوزن الجزيئي لـ DNA لهاتين العزلتين مما يؤكد عدم تطابق أو تشابه هاتين العزلتين .



6 الخلاصة :-

ثم في هذا البحث دراسة ارتباط المقاومة ببلازميد بعض العزلات من بكتيريا *K.Pneumoniae* , وتضمنت الدراسة الحصول على 8 عزلات من المتحف الميكروبي بمستشفى سبها الطبي حيث تم إجراء اختبار الحساسية لجميع العزلات , وجد أن جميعها تحمل نمط المقاومة اتجاه المضادات الحيوية (Amoxicillin ,Amoxicillin/ ClavulanicAcid , Penicillin , Nitrfurantion ,Ceftriaxon ,Ampicillin,Ceftazidime,Erythromycin) بنسبة 100% , في حين كانت جميع العزلات حساسة للمضادين الحيويين (Ciprofloxacin,Imipenem) بنسبة 100 % .

بينت نتائج المحتوى البلازميدي للعزلات قيد الدراسة احتواء معظمها على حزمتين بلازميديتين مختلفتي الحجم , وأخرى على ثلاثة حزم وبلازميدات كبيرة (Miga Plasmid) .

تم إجراء التحول الوراثي لمحتوى العزلتين *K167,K193* أبدت مقاومة عالية للمضادات الحيوية مع السلالة المستلمة *E.coli* , بينما استطاعت التحول الوراثي على الوسط الصلب لمضاد CRO , وارتفعت معدل الحساسية لمضاد CN.

التوصيات :

1. إجراء دراسة تأكيدية وأكثر توسعاً حول الموضوع .
2. ضرورة إجراء دراسة لعزل بكتيريا *K.Pneumoniae* من وحدات العناية المركزة وأجهزة الغسيل الكلوي و أجهزة الحضانة بقسم الحواضن وغيرها من الأجهزة الطبية لمعرفة مدى انتشار هذه البكتريا على أسطح هذه الأجهزة .
3. إجراء دراسة موسعة على المضاد Imipenem وإمكانية استخدامه بوصفه علاج فعال لعلاج الإصابات الناتجة عن بكتيريا *K.Pneumoniae*.
4. لإنجاح عملية التحول الوراثي نوصي استخدام سلالة مرجعية من *E.Coli* في عملية التحول الوراثي , حيث تكون السلالة المستخدمة ذات حساسية عالية لعدد كبير من المضادات الحيوية .
5. إتباع الإجراءات الوقائية للحد من ظهرت مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية .



المصادر العربية :

1. التومي عبدالرزاق سليمان ود.محمد محمد الإمام و عبد الباسط رمضان أبو زويده (2013)، أساسيات التشخيص البكتيريولوجي المعلمي والسرييري، مركز بحوث التقنيات الحيوية.
2. الدليمي تساهيل حامد كاظم (2017) دراسة مقاومة بكتريا *Klebsiellapnumoniae* للمضادات الحيوية باستخدام جهاز Vitek2 المعسولة من عينات سريرية، مجلة جامعة بابل، العلوم الصرفة والتطبيقية، العدد 4، المجلد 25.
3. الفيصل. عبدالحسين (1999)، الهندسة الوراثية، الطبعة الاولى، دار الشروق للنشر و التوزيع، عمان- المملكة الأردنية.
4. المرجاني، محمد فرج. (2011). المضادات الحيوية المقاومة الحيوية البكتيرية للمضادات الحيوية. عمان : دار دجلة.
5. فرج ديمة نزار، قيس قاسم غنيمه (2010) تحييد البلازميد لبكتيريا *Klebsiellapneumoniae* المعزولة محليا من التهابات المجاري البولية ودوره في المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية، المجلة العراقية للعلوم، المجلد 51، العدد 3، الصفحة-415,421.
6. محمد زينة جاسم، علي حازم عبدالكريم، احمد عبدالجبار سليمان (2015) استخدام تقنية Multiplex PCR لتشخيص بعض جينات الضراوة لبكتيريا *Klebsiellapneumoniae* المعزولة من مواقع بيئية مختلفة، مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة، المجلد التاسع، العدد الاول.
7. نجيب ليث مصلىح (2011)، دراسة دور بلازميدات بعض العزلات البكتيرية تجاه بعض المضادات الحيوية، مجلة جامعة الأنبار للعلوم الصرفة، المجلد الخامس، العدد الثالث.
8. نجيب ليث مصلىح، نعمه فميح عمر، و رنا كاظم محمد (2016) التشخيص الجزيئي لأنماط المصلية K1 و K2 للكليبيسيلا الرئوية المعزولة من اخماج الجروح والحروق، مجلة الأنبار للعلوم البيطرية، المجلد 9، العدد 1.

9. نجيب ليث مصلح. (2007). إنتاج البكتريوسينات من بكتريا حامض اللبنيك ودارسة بعض خواصه. أطروحة دكتوراه ، كلية العلوم / جامعة الانبار
10. Stephen A. Norrell , Karen E. Messley. (2011) الكتاب العملي للأحياء المجهرية الأسوت طبيقات . ترجمة أ.د. تحرير رمضان الحديثي و د. عبد القادر السنوسي الزين الاوجلي , بقسم علم النبات كلية العلوم جامعة سبها.

المصادر الانجليزية :

- Atlas R.M.; Brown,A.E.; and Parks,L.C.(1995) Laboratory Manual Experimental Microbiology. 1th ed. Mosby Yearbook, Inc. P: 888.
- Al-Charrakh^b,A.H. , Alwash,M.S. and Al-Husaini,W.K (2011); Antibiotic Susceptibility of Enterobacteria Isolated from one Hospital in Hilla,Iraq .**J. of Babylon University /Pure and Applied Sciences / No.(1)/Vol.(19).**
- Al-Agamy, M. H. (2012) ; Genetic basis of cefotaxime resistant isolates of Klebsiella pneumoniae from Cairo . **Afr. J.of Microbiology Research** Vol. 6(1), pp. 20-27.
- Ahmed, V.U.; Hussain, J.; Hussain, H.; Jassbi, A.R.; Ullah, F.; Lodhi, M.A.; Yasin, A. and Choudhary, M.I. (2003). First natural urease inhibitor from Euphorbia decipiens. **Chem. Pharm. Bull.** 51(6): 719-23 .
- Benenson,S. , Temper,V. , Cohen,M.J. , Schwartz,C. , Carlos HidalgoGrass,C. and Colin Block,C.(2011); Imipenem Disc for Detection of KPC Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Clinical Practice. **J.of clinical microbiology**, Vol. 49, No. 4. pp. 1617–1620 .

-
- Brooks , G. F.; Butel , J. S.;Carroll, K. C. and Morse, S. A. (2007) .
Jawetz , Melnick , J.L. and Adlebergs Medical Microbiology , 24th
ed. A large medical book.
 - Damian, M. , Usein, C. , Palade, A. , Cechiu, S. and Cosman, M. (2009)
; Molecular Epidemiology and Virulence Characteristics of Klebsiella
pneumoniae Strains Isolated from Hospital-Associated Infections. **The
Open Epidemiology. J.** , , p, 69-78
 - CLSI, (Clinical and laboratory standars in statute) (2018)This
document includes updated tables for the Clinical and Laboratory
Standards Institute antimicrobial susceptibility testingstandards M02,
M07, and M11. M100-S28.
 - Clements, A. , Gaboriaud, F. , Duval,J. F. L. , Farn, J. L. , Jenney, A.
W. , Lithgow, T. , Wijburg, O. L. C. , Hartland, E. L. , Strugnell, R.
A., (2008) ; The Major Surface-Associated Saccharides of Klebsiella
pneumoniae Contribute to Host Cell Association. PLoS ONE 3(11):
/journal.pone. p.1-10 .
 - Donlan, R.M. and Costerton, J.W. (2002). Biofilms: survival
mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin. Microbiol.
Rev. 15:167-193 .
 - Fangqing et al, April 12, 2010,Sequencing and Genetic Variation of
Multidrug Resistance Plasmids in Klebsiella pneumonia , plos one.
 - Gascon J., Vargas M.,Schellenberg D.,Urassa H.,Casals C.,
et al.(2000).Diarrhea in children under 5 years of age from Ifakara ,
Tanzania :a case-control study .American Society for Microbiology
.38(12);4459-4462
 - Greenwood, D. , Slak, R. , Peutherer, J. and Barer, M. (2007) ;
Medical microbiology. 7th ed. Churchill Livingstone Elsevier. Part 3.

-
- Gillor ,O., Nigro,L.M. and Riley, M .A .(2005). Genetically Engineered Bacteriocins and their Potential as the Next Generation of Antimicrobials .Genetically Engineered Bacteriocins . Vol .15:1-9 .
 - Kumar ,A. and Talwar ,A ,(2010). Antimicrobial Resistance Patterns of Klebsiella spp. Isolated from Raw Milk of Doon Valley. **Microbiology and Molecular Biology** .Vol .1,Nu.1,:pp.21-35.
 - Katzung, B.G. (2001). Basic and Clinical Pharmacology. (8th) ed. Lange Medical Books. McGraw-Hill. New York.
 - Kumar, V. , Sun, P. , Vamathevan, J. , Li, Y. , Ingraham, K. , Palmer, L. , Huang, J. and Brown, J. R. (2011) ; Comparative Genomics of Klebsiella pneumoniae Strains with Different Antibiotic Resistance Profiles. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Vol. 55, No. 9 p. 4267–4276.
 - Liaw, S.J. ; AI, H.C. ; HO, S.W. ; Luh, K.T. and Wang, W.B. (2000). Inhibition of virulence factor expression and swarming differentiation in Proteus mirabilis by p-nitrophenly glycerol. **J. Med. Microbiol.** 49: 725731 .
 - Luders,T.;Birkemo,G.A.;Fimland,G.;Nissen-meyer, J.& Nes,L.F. (2003). Strong synergy between eukaryotic antibacterial peptide and bacteriocins from lactic acid bacteria .**Appl.Environ.Microbiol.**,69(3):1797-1799.
 - Laurence, D.R.; Bennett, P.N.; and Brown, M.J. (1997). Clinical Pharmacology. (8th)ed .Churchill Livingstone London.
 - Lambert,O.; Michea-Hamzhepour, M.; Kohler, T.; Chau,F.; Fanrisson, F.; Dautrey, S.; and Pechere, J. (2001) Differential selection of multidrug efflux mutants by travafloxacin and ciprofloxacin in an Experimental model of Pseudomonas aeruginosa acute pneumonia in rats. **Antimicrob. Agents Chemother.** 44: 571 — 576.

-
- Lin, Y. C.; Min, C. L.; Hui, L. T.; Hsu, C. L.; Ching, H. C.; Keh, S. L.; Chingju, L.; Chien, S. C.; Ming, K. C.; Chuan, M. C. & Yi, C. L. (2011). Assessment of hypermucoviscosity as a virulence factor for experimental *Klebsiella pneumoniae* infections: comparative virulence analysis with hypermucoviscosity-negative strain. *BMC. Microbio.*, 11(50):1-8.
 - Michael R. Mulvey Comments to Author , Jennifer M. Grant, Katherine Plewes, Diane Roscoe, and David A. Boyd (2011)-New Delhi Metallo- β -Lactamase in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, Canada-centers , Volume 17, Number 1—January 2011.
 - Maldonado,N.C , Silva de Ruiz,C. , Cecilia,M. and NaderMacias,M.E.(2007):A simple technique to detect *Klebsiella* biofilmforming-strains. Inhibitory potential of *Lactobacillus fermentum* CRL 1058 whole cells and products. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology* . A.MendezVilas(Ed.)p.52-57 .
 - Mandell, G.L.; Bennet, J.E.; and Dolin, R.(1995). *Principles & Practice Of Infectious Diseases*. (4th) ed. Churchill Livingstone, London.
 - Naas, T; Zerbih, M; Girlich, D.; Nordmann, P. (2003). Integration of Transposon Tn1- Encoded inhibitor resistant β -Lactamase Gene blaTEM-67 from *Proteus mirabilis*, into the *Escherichia coli* chromosome. **J. Antimicrob. Chemoth.** 47 (1): 19-20.
 - Patrice Nordmann MD Gaele Cuzon Pharm D Thierry Naas PhD, April 2009 ,The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria *The Lancet Infectious Diseases Science Direct* Volume 9, Issue 4 Pages 228-236.

- Riley, M.A. (1998). Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. *Annu. Rev.Genet.* ,32 : 255–278.
- Rohollah Khodadadian, Hossein Ali Rahdar, Ali Javadi , Mahmood Safari ,Ahmad Khorshidi , February 2018 , Detection of VIM-1 and IMP-1 genes in *Klebsiella pneumoniae* and relationship with biofilm formation , *Microbial Pathogenesis Science Direct* ,Volume 115, Pages 25-30
- Sharmeen, R. , Hossain, N. , Rahman, M. , Foysa, J. and Miah, F. (2007) ; In-vitro antibacterial activity of herbal aqueous extract against multi-drug resistant *Klebsiella* sp. isolated from human clinical samples . **International Current Pharmaceutical .J.**, 1(6): 133-137 .
- Turton J.F, Perry C, Elgohari S and Hampton C.V(2010).PCR characterization and typing of [9] *Klebsiella pneumoniae* using capsular type- specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets. *Journal of Medical Microbiology*, 59;PP.541-547.
- T.Maniatis (2001)molecular Cloning ,A LABORATORY MANUAL ON THE WEB ,by Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Tortora ,G. ;Funke ,B. and Case,C.(2004). *Microbiology*.8th .Ed . Pearson Benjamin Cumming.USA.
- Tanaka, T.; Kawase, M.; Tani, S.(2003). Urease inhibitory activity of simple α , β -unsaturated ketones. **Life Sciences**. 73: 2985-90.
- Umeh,O.;Berkowitz,L.;Shepp,D.;Talavera,F.;King,J.;Mylonakia,E. & Cunha , B. (2006). Infectious disease, *Klebsiella Infection* .**J .eMdicine.**,27: (1).