P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) **مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة** Open Access
2016,10 (1) :01-06

عزل وتشخيص بكتريا الكليبسيلا *Klebsiella spp* من مواقع بيئية مختلفة وأجراء دراسة مقارنة لحساسية العزلات تجاه بعض مضادات الحيوية

نغم معد حمدي * **ليث مصلح نجيب ****

* جامعة الأنبار – كلية التربية للعلوم الصرفة

**جامعة الأنبار – كلية العلوم

معلومات البحث:

تاريخ التسليم: 2017/01/02
تاريخ القبول: 2017/1/6
تاريخ النشر: 20 / 4 / 2017
DOI:10.37652/juaps.2016.132430

الكلمات المفتاحية:

بكتريا الكليبسيلا
Klebsiella spp.،
المقاومة للمضادات الحيوية.

الخلاصة:

أن الهدف من هذه الدراسة هو عزل بكتريا *Klebsiella spp* من مواقع بيئية مختلفة (الأنسان، التربة، الماء) ودراسة مقارنة لحساسيتها تجاه بعض مضادات الحيوية. إذ تم جمع247 عينة سريرية وبيئية من مصادر مختلفة من محافظة بغداد (الأدرار والقشع والحروق والجروح ومياه إسالة ومياه الصرف الصحي وتربة زراعية وتربه حقول الدواجن). وقد بينت نتائج الزرع البكتيري والفحوصات المجهرية والكيموحيوية وجهاز الفايتك أن46 عزلة تحمل صفات بكتريا *Klebsiella spp.*، ثم أختبرت حساسية عزلات بكتريا *Klebsiella* تجاه 7 مضادات حيوية بأستخدام طريقة الأنتشار حول الأقراص، أظهرت النتائج أن؛ عزلة(95%) كانت مقاومة لمضاد Augmantin و38 عزلة(82.6%) مقاومة لمضاد Cefotaxime وأبدت العزلات أيضاً مقاومتها للتتراسايكلين Tetracycline بنسبة 76%، كما أظهرت العزلات حساسية جيدة أتجاه كل من المضادات Imipenem،Imikacin، Aztreonam، Gentamicin. من جانب أخر أظهرت النتائج أن هناك تباين في أستجابة العزلات للمضادات الحيوية تبعاً للموقع البيئي للعزل، إذ أظهرت النتائج أن العزلات الأكثر مقاومة هي العزلات المرضية المأخوذة من نموذج الجروح والحروق وخصوصاً تجاه مضاد Augmantin ومضاد Cefotaxime، بينما كانت العزلات المأخوذة من ماء الإسالة والتربة الزراعية الأكثر حساسية خصوصاً تجاه المضادات Imikacin، Imipenem، Aztreonam، Gentamicin .

المقدمة:

تعود بكتريا الكليبسيلا إلى العائلة المعوية *Enterobacteriaceae* التي أكتشفها العالم الالماني Edwan Klebs عام 1834 وسميت بأسمه، وفي عام 1882 شخصها لأول مره العالم Fried Landers وسميت بعصيات فريدلاندر Fried Landers Bacilli. إذ تعد من أهم مجاميع الأحياء المجهرية الملوثة للتربة والمياه والتي تؤدي إلى أمراض عديدة سواء للإنسان أو الحيوان أو النبات، كما تعد من الممرضات الأنتهازية السالبة لملون كرام التي تسبب العديد من الأمراض المكتسبة في المستشفيات كإلتهاب القناة البولية (UTI) وإلتهاب الرئة المكتسب Community acquired pneumonia وغيرها من الأمراض [1]، إذ تعزى قدرة هذه البكتريا على إحداث الإصابة لأمتلاكها صفة المقاومة للمضادات الحيوية كمضادات البيتالاكتام المحللة للبنسلينات والسيفالوسبورينات التي تشكل مشكلة عالمية كبيرة [2]، كما فسر [3] سبب هذه المقاومة إلى الأستعمال المتزايد والمتكرر لهذه المضادات الذي رافقه ظهور سلالات مطفرة أمتازت بمقاومتها العالية لهذه المضادات. وقد أستطاعت البكتريا خلال العقود الأخيرة تطوير أليات

* Corresponding author at: University of Anbar - College of Education for Pure Sciences .E-mail address: Nugha-m@yahoo.com

عديدة لمقاومة المضادات الحيوية كأنتاجها لأنزيمات البيتالاكتاميز Lactamase–β التي تعمل على تحطم حلقة البيتالاكتام وجعلها جزيئات غير فعالة وغيرها من الأليات الأخرى التي أدت إلى زيادة نسبة الإصابات المكتسبة في المستشفيات وتفشي حالات وبائية في العالم. وقد أشارت دراسة [4] إلى وجود البلازميدات Plasmids التي تعد ناقل مهم للجينات المسؤولة عن ظهور المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية وأنتقالها بين الأجناس. ومن هنا برزت فكرة عزل عدد من عزلات بكتريا الكليبسيلا ومن بيئات مختلفة ودراسة حساسيتها لعدد من المضادات الحيوية وبالتالي محاولة التعرف ولو بشكل أولي عن المصادر البيئية الأساسية للعزلات المرضية.

المواد وطرائق العمل:

جمعت (247) عينه بيئية ومرضية من بيئات مختلفة من محافظة بغداد للفترة بين 2016/1/29 ولغاية 2016/5/1 وقد شملت العينات 48 عينة من الأدرار، 69 عينة من أصابات الجروح والحروق من مستشفى اليرموك التعليمي، 36 عينة من قشع المصابين بذات الرئة، 19 عينة مياه صرف صحي، 38 عينة من مياه الأسالة، 16 عينة من التربة الزراعية، 21 عينة من تربة حقول الدواجن. إذ تم أجراء الفحص المجهري المباشر لكل عينة ثم زرعت العينات بعدها على أوساط تفريقية وأنتخابية متمثلة بوسط أكار الدم ووسط أكار الماكونكي لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 ْم ثم تم تنقيتها على وسط الأكار المغذي للحصول على مستعمرات نقية، وبعدها أجريت للعزلات النامية الأختبارات التشخيصية والفحوصات الكيموحيوية وبالأعتماد على المصادر العلمية المتبعة لتشخيص البكتيريا [5] فضلاً عن التشخيص بجهاز الفايتك، ثم بعد ذلك أختبرت حساسية جميع العزلات البكتيرية المرضية والبيئية تجاه 7 مضادات حيوية ذات تراكيز قياسية مختلفة هي (Cefotaxime، Imipenem، Augmentin، Aztreonam Gentamycin، Tetracycline،Amikacin)، وذلك بأتباع طريقة الأنتشار حول الأقراص Disc Diffusion Method بأستخدام وسط مولر– هنتون، ثم قيست أقطار مناطق التثبيط حول كل قرص وقورنت بالقياسات العالمية المعتمدة.

النتائج والمناقشة:

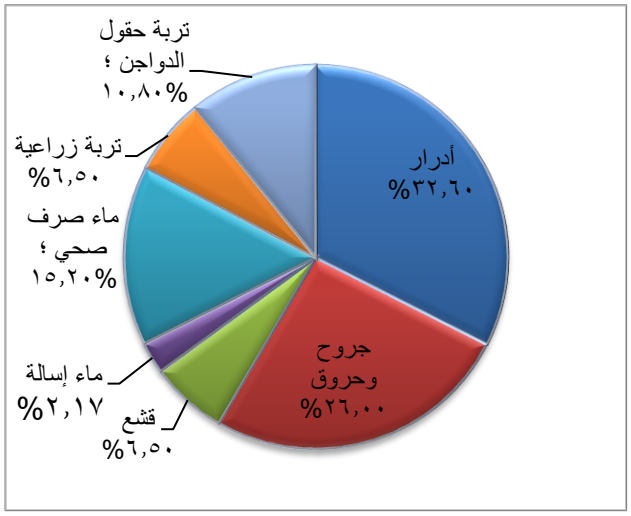
عزل وتشخيص البكتريا:

أسفرت عملية زرع البكتريا على وسط أكار الماكونكي عن ظهور مستعمرات محدبة ملساء وردية اللون براقة ذات قوام مخاطي، كما أظهرت الفحوصات المجهرية والكيموحيوية على أنها عصيات قصيرة سالبة لملون كرام موجبة لأختبارات الكاتاليز والفوكس بروسكاور وأستهلاك السترات وسالبة لأختبارات الأوكسيديز والحركة وهذا ما تم تأكيده عند الفحص بجهاز الفايتك، إذ بينت نتائج التشخيص أن 46 عزلة بكتيرية تحمل صفات بكتريا *Klebsiella spp* وبنسبة 18.6 % من المجموع الكلي للعينات، وقد يعود السبب في عدم ظهور عزلات بكتيرية أكثر إلى أحتمالية المعالجة بمضادات حيوية قد تكون لها الأثر في خفض نسب البكتيريا المعزولة. وتوزعت العزلات كما في الجدول (1) والشكل (1)، بواقع 30 عزلة بكتيرية من حالات مرضية مختلفة (الأدرار، القشع، الجروح والحروق) وبنسبة 65.2 % من المجموع الكلي للعزلات، و8 عزلات بكتيرية بنسبة 17.4 % تم عزلها من التربة (تربة زراعية، تربة حقول الدواجن)، و8 عزلات بكتيرية معزولة من مصادر مختلفة من المياه (ماء الإسالة، ماء الصرف الصحي) وبنسبة 17.4 %.

جدول (1) أعداد بكتيريا *Klebsiella* spp المعزولة من عينات سريرية وبيئية مختلفة

نوع العينة	عدد العينات	النسبة المئوية	عدد بكتريا *Klebsiella spp*
أدرار	48	% 19.4	15
جروح وحروق	69	% 28	12
قشع	36	% 14.5	3
ماء صرف صحي	19	% 7.7	7
ماء إسالة	38	% 15.4	1
تربة زراعية	16	% 6.5	3
تربة حقول الدواجن	21	% 8.5	5
المجموع	247	% 100	46

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (JUAPS) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2016,10 (1) :01-06



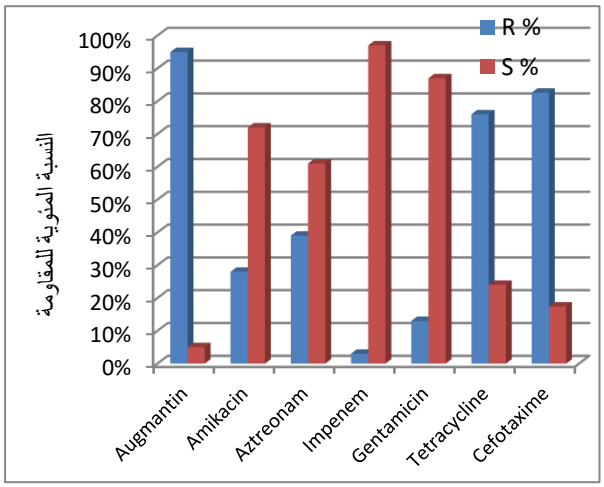
الشكل (1) النسبة المئوية للعزلات البكتيرية قيد الدراسة

وهذه النتائج جاءت مقاربة إلى النتيجة التي توصل إليها الباحث [6] إذ كانت نسبة *Klebsiella pneumonia* في عينات الأدرار 21.8 %، كما تقاربت النتائج مع ما توصل اليه الباحث [7] إذ بلغت نسبة هذه البكتيريا في عينات القشع 12 %، وقد يعود سبب الأختلاف في هذه النسب إلى أختلاف مكان جمع العينات وأختلاف الظروف الصحية التي يعيشها المرضى، ويعود السبب إلى أنتشار هذه البكتريا في بيئات المستشفيات إذ أنها تعد من أكثر الأنواع تفشياً في المستشفيات لقدرتها على تطوير وسائل مختلفة لمقاومة المطهرات ومضادات الحيوية.

أختبار حساسية البكتريا للمضادات الحيوية :

درست حساسية العزلات البكتيرية المرضية والبيئية تجاه 7 مضادات حيوية وبينت النتائج في الشكل (2) أن هناك تباين في العزلات بالنسبة لمقاومتها للمضادات الحيوية فوجد أن نسبة المقاومة الكلية للعزلات المرضية والبيئية تجاه مضاد Aztreonam كانت 39 % من مجموع العزلات الكلية، وهذه النتيجة مقاربة لنتائج الباحث [8]، إذ بلغت مقاومة العزلات لهذا المضاد 45.5 %، كما وجد أن مقاومة العزلات تجاه مضاد Augmentin كانت بنسبة 95 % وهذه النتيجة مقاربة للنتيجة التي تحصل عليها الباحث [9] إذ كانت العزلات مقاومة إتجاه هذا المضاد بنسبة 100 % ولم تتفق هذه النتيجة مع نتيجة الباحث [10] إذ كانت العزلات مقاومة بنسبة 35 %، وقد تعود هذه المقاومة العالية إلى الاستعمال العشوائي للمضادات الحيوية من قبل المرضى. أما مقاومة البكتريا لمضاد Cefotaxime كانت بنسبة 82.6 % وهذه النتيجة مطابقة لنتيجة الباحث [11] إذ بلغت نسبة المقاومة تجاه هذا المضاد 82 %، وقد يعود سبب المقاومة إلى حدوث تغير في حاجز النفاذية إذ يحتوي الغشاء الخارجي للبكتيريا قنوات بروتينية تدعى البورين تعمل على منع دخول المضادات إلى داخل الخلية البكتيرية [12]. في حين سجلت العزلات البكتيرية حساسية كبيرة تجاه مضاد Imipenem فقد كانت نسبة مقاومة العزلات لهذا المضاد 3 % وقد يعزى ذلك إلى عدم أمتلاك هذه العزلات للبلازميدات التي تساهم في زيادة مقاومة البكتريا لهذه المضادات ويدل هذا على أن المضاد الحيوي Imipenem هو من أكثر المضادات تثبيطاً لنموالعزلات البكتيرية مما قد يجعله العلاج الأفضل لأخماج هذه البكتريا.

أما بالنسبة لمضادات مجموعة الأمينوكلايكوسيدية Gentamycin، ومضـــاد Amikacin فـقد كانت نسبة مقاومتهما 13 %، 28 % على التتابع، وجاءت هذه النتائج مقاربة لما توصل إليه [13] بالنسبة لمضاد Gentamycin الذي بلغت مقاومة العزلات له 16 % وتعزى حساسية البكتريا لهذه المضادات إلى دليله العلاجي الضيق والمتمثل بأرتفاع سميته داخل الجسم أو إلى عوامل أخرى تتأثر بها العزلات البيئية. أما مضاد Tetracycline فكانت نسبة مقاومة العزلات البكتيرية له76 %. كما أظهرت العزلات المرضية والبيئية المعزولة مقاومتها لأكثر من مضاد حيوي واحد.



شكل (2) النسبة المئوية لمقاومة وحساسية بكتريا *Klebsiella spp* تجاه المضادات الحيوية

من جانب أخر أظهرت النتائج الموضحة في الجدول (2) أن العزلات المأخوذة من النموذج المرضي (الأدرار) قد قاومت مضاد Augmentin ومضاد Tetracyclineبنسبة 93.3% وهذه تعد من أكثر العزلات مقاومة للمضادات الحيوية، كما بلغت نسبة مقاومتها لمضاد Cefotaxime 66.6%، في حين بلغت نسبة مقاومتها للمضادات Gentamicin،،Impenem، Aztreonam 6.6%، 20%، 6.6% على التتابع، كما أمتلكت حساسية كبيرة تجاه مضاد Amikacin بنسبة 100%. أما العزلات المأخوذة من (الحروق والجروح) فقد قاومت مضاد Augmentin بنسبة 91.6%، كما بلغت نسبة مقاومتها للمضادين Amikacin و Aztreonam 83.3% ولمضاد Cefotaxime 100%، في حين سجلت العزلات حساسية كبيرة تجاه مضاد Impenem بلغت 100% أما نسبة مقاومتها تجاه المضادين Gentamicin و Tetracycline فقد بلغت 8.3%، 50% على التوالي. كما لوحظ أن العزلات المأخوذة من (القشع) مقاومة بنسبة 33.3% تجاه كل من المضادات Amikacin،Gentamicin، Tetracycline وبنسبة 100% تجاه Augmentin، Cefotaxime كما وجد أنها مقاومة بنسبة 66.6% تجاه مضاد Aztreonam، كذلك سجلت العزلات حساسية كبيرة بنسبة 100% لمضاد Impenem.

جدول (2) مقاومة العزلات البكتيرية المرضية والبيئية للمضادات الحيوية

المضادات الحيوية	بكتيريا *Klebsiella spp* No:(46)							
	مصدر العزلات المقاومه وعددها ونسبتها المئوية							
	الادرار	الحروق والجروح	القشع	ماء اسالة	ماء صرف صحي	تربة زراعية	تربة حقول دواجن	مجموع العزلات المقاومة
Augmentin 30 mg/disk	14 (93.3%)	11(91.6%)	3 (100%)	1(100%)	7 (100%)	3 (100%)	5 (100%)	44 (95%)
Amikacin 30 mg/disk	-	10(83.3%)	1 (33.3%)	-	2 (28.5%)	-	-	13 (28%)
Aztreonam 30 mg/disk	3 (20%)	2 (66.6%)	-	2 (28.5%)	-	-	1 (20%)	18 (39%)
Imipenem 10 mg/disk	1 (6.6%)	-	-	-	-	-	-	1 (3%)
Gentamicin 10 mg/disk	1 (6.6%)	1 (8.3%)	1 (33.3%)	2 (28.5%)	2 (20%)	1 (20%)	1 (20%)	6 (13%)
Tetracycline 30 mg/disk	14(93.3%)	6(50%)	1 (33.3%)	1(100%)	7 (100%)	2 (66.6%)	4 (80%)	35 (76%)
Cefotaxime 30 mg/disk	10(66.6%)	12(100%)	3 (100%)	1(100%)	6 (85.7%)	3 (100%)	3 (60%)	38 (82%)
المجموع الكلي للعزلات	15	12	3	1	7	3	5	46

أما بالنسبة للعزلات البيئية فلوحظ أن العزلات المعزولة من النموذج البيئي (ماء الإسالة) أبدت مقاومة تجاه كل من المضادات Augmentin، Tetracycline. Cefotaxime بنسبة 100%، في حين سجلت حساسية كبيرة تجاه مضادات Aztreonam. Gentamicin. Impenem. Amikacin. كما وجد أيضاً أن العزلات المعزولة من (ماء الصرف الصحي) مقاومة بنسبة 100% لل Augmentin. Tetracycline، كما أبدت مقاومة أقل تجاه مضاد Cefotaxime وبنسبة 85.7%، وأظهرت العزلات أيضاً مقاومة بنسبة 28.5% تجاه Gentamicin. Aztreonam. Amikacin، كما أظهرت حساسية بنسبة 100% لمضاد Impenem. أما بخصوص العزلات المعزولة من (التربة الزراعية) فقد أبدت مقاومة بنسبة 100% تجاه Augmentin. Cefotaxime أما مقاومتها لمضاد Tetracycline فقد بلغت 66.6% في حين أظهرت حساسية كبيرة تجاه بقية المضادات. وفيما يخص العزلات المعزولة من (تربة حقول الدواجن)

فوجد أنها مقاومة لمضاد Augmentin وبنسبة 100%، أما بالنسبة للمضادين Gentamicin. Aztreonam فقد بلغت نسبة مقاومة العزلات تجاههما 20%، كما تقاربت نسبة مقاومة العزلات للمضادين Tetracycline. Cefotaxime فقد بلغت نسبة مقاومة العزلات لـ Tetracycline 80% و لـ Cefotaxime 60%، كما لوحظ أنها حساسة تجاه المضادين Impenem. Amikacin. ونستنتج من ذلك أن العزلات المرضية المعزولة من نموذج الجروح والحروق هي أكثر العزلات مقاومة للمضادات الحيوية التي أبدت مقاومتها لـ 6 مضادات حيوية وقد تعود صفة المقاومة هذه إلى الأستعمال المفرط غير الرشيد لتلك المضادات من قبل المرضى المراجعين أو الراقدين في المستشفى أو لأحتوائها بلازميدات تحمل الجينات المسؤولة عن صفة المقاومة للمضادات الحيوية بالنسبة للعزلات البكتيرية المرضية والبيئية [14]، وأكثر العزلات حساسة للمضادات الحيوية هي العزلات البيئية المعزولة من ماء الإسالة والتربة الزراعية التي أبدت حساسيتها تجاه 4 مضادات حيوية وبنسبة 100% هذا وتعد كل من المضادات Augmentin. Tetracycline. Cefotaxime من أكثر المضادات مقاومة من قبل العزلات المرضية والبيئية المعزولة في حين يعد مضاد Impenem من أكثر المضادات تثبيطاً لنمو العزلات البكتيرية المرضية والبيئية مما يجعله العلاج الأفضل لأخماج هذه البكتريا.

المصادر:

1. Chan, Y.; Liu, J.; Pociask, D.; Zheng, M.; Mietzner, T. and Berger, T.**(2009)** Lipocalin 2 is required for pulmonary host defense against Klebsiella infection. J Immunol. 182(8) 47 – 56.
2. 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 .
3. Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A. K., Wertheim, H. F., Sumpradit, N., …& Greko, C. **(2013)** Antibiotic resistance the need for global solutions. The Lancet infectious diseases, 13(12), 1057-1098.
4. Woodford, N.,Turton,J.F.,& Livermore, D.M.**(2011)**. Multiresistant Gram-negative bacteria : the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. FEMS microbiology reviews. 35(5).736-755 .
5. MacFaddin, J.F.**(2000)** Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3rd edition Lippincott, Williams and Wilkins. Philadelphia. London.
6. **الزبيدي، محمد مهدي عبدالمحسن (2012)**. دور البلازميدات في أنتاج البكتريوسين من بكتيريا *Klebsiella spp.* المعزولة من عينات سريرية. رسالة ماجستير، معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الأحيائية، جامعة بغداد.
7. **حبيب، علاء سالم حمزة (2009)**. دراسة وراثية للبكتريوسين المنتج من بكتيريا *Klebsiella spp* المعزولة من مصادر سريرية مختلفة.رسالة ماجستير، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية.
8. **الزنكنة، إيمان عباس علي (2012)**. دراسة بكتريولوجية ووراثية لبكتيريا *Klebsiella spp* المعزولة من أصابات مرضية مختلفة. رسالة ماجستير، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة ديالى .
9. **فليح، عمر نعمة (2016)** . عزل وتشخيص البكتيريا المسببة لأخماج الجروح والحروق ودراسة بعض عوامل ظراوتها وراثياً. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الأنبار.
10. **النعيمي، أبتهال محمد زاهد (2002)**. الأخماج البولية عند النساء الحوامل. رسالة ماجستير، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية .
11. Qasim,F.G.**(2005)** Detection of acrA and ramA genes and Antibiotic susceptibility in Klebsiella pneumoniae isolated from Clinical Samples.M.S thesis college of science, Al-Mustansiryah University.
12. Spanu, T.; Luzzaro, F.; Perilli, M.; Amicosanti, G.; Toniolo, A.; Fadda, G. and the Italian ESBL study group **(2002)**. Occurance of extendedspectrum-B. lactamas and other antimicrobial drug. Antimicrobial Agent and Chemotherapy. Jun.46 (1) : 196 – 202.

A.. Actis, L. A.. Marcelo E. and Tolmasky, M. E. (2008) ; Klebsiella pneumoniae Multiresistance Plasmid pMET1:Similarity with the Yersinia pestis Plasmid pCRY and Integrative Conjugative Elements. PLoS ONE 3(3): 1-9.

13. **العتبي، دعاء عدنان كاظم (2013)**. دراسة بكتيريولوجية لبعض أنواع العائلة المعوية المعزولة من صالات مستشفى الولادة في مدينة بعقوبة. رسالة ماجستير، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة ديالى.

14. Bistue, A. J. C. S.. Birshan, D.. Tomaras, A. P.. Dandekar, M..Tran, T.. Newmark, J.. Bui, D.. Gupta, N.. Hernandez, K.. Sarno, R.. Angeles Zorreguieta,

Isolation and diagnosis of *Klebsiella spp* from different environmental sites and a comparative study of it's susceptibility against some antibiotics

Nagham M. Hamdi * Laith M. Najeeb**

E-mail - Nugha-m@yahoo.com

Abstract:

The aim of this study is to isolation of *Klebsiella spp*. from different environmental sites (Human. Soil, Water) and study their susceptibility against some antibiotics. 247 clinical and environmental samples were collected from different sources from Baghdad governorate (urine and sputum, burns. wounds. water liquefaction. sewage. agricultural soil. soil of poultry farms). The results of bacterial cultural.microscopical and biochemical tests, and Vitik -2- compact dvice had shown that 46 isolates were belong to *Klebsiella spp*., the susceptibility of these isolates toward 7 antibiotics were done by using by the diffusion method disk, and the results showed that 44 isolates (95%) were resistant to Augmantin and 38 isolates (82.6%) to Cefotaxime. tetracycline (76%), while isolates showed good sensitivity toward Imikacin, Imipenem, Aztreonam, Gentamicin. On the other hand the results showed that there is variation in the response of these isolates to antibiotics according to the environmental sites. the burns and wounds clinical samples were more susceptibal toward Augmantin and Cefotaxime, while the isolates which were taken from water, agricultural soil were sensitive towards Imikacin. Imipenem. Aztreonam. Gentamicin.