مجلة الدراسات التربوية والعلمية - كلية التربية - الجامعة العراقية
العدد العشرون - المجلد الأول - علوم الحياة - تشرين أول 2022 م
doi.org/10.52866/esj.2022.01.20.15

عزل وتشخيص بكتريا الكليبسيلا الرئوية من اصابات المجاري البولية في الأنسان ودراسة حساسيتها للمضادات الحيوية

حسام مجيد محمد ، خالد محمود حمادي
الجامعة العراقية / كلية التربية - قسم علوم الحياة

مستخلص:

هدفت هذه الدراسة الى عزل بكتريا الكليبسيلا الرئوية من إصابات الجهاز البولي في الانسان اذ تم في هذه الدراسة جمع 100 عينة ادرار من الانسان واظهرت نتائج العزل البكتيري من هذه العينات الحصول على 17 عزلة عائدة لبكتريا الكليبسيلا الرئوية من الانسان وشخصت هذه العزلات مختبريا عبر الزرع البكتريولوجي على وسط الماكونكي ووسط اكار الدم ووسط الايوزين- مثلين الازرق وكذلك اجريت الفحوصات الكيموحيوية وأخيرا ثبتت العينات بجهاز الفايتك (Vitek_2) للتأكد من عائديتها لبكتريا الكليبسيلا الرئوية. وتم اجراء فحص الحساسية للمضادات الحيوية للعينات المعزولة اذ أظهرت بكتريا الكليبسيلا الرئوية مقاومة عالية تجاه مضادات Amoxicillin و Penicillin و Erythromycin و Amikacin وبنسب ٪100 و٪100 و٪100 و90 ٪ بالتتابع في حين كانت مقاومة البكتريا لمضادات Ciprofloxacin و Cefotaxime و Tobramycin اقل نسبيا اذ كانت بالنسب 86 ٪ و70 ٪ و85 ٪ بالتتابع بينما كانت البكتريا حساسة لمضادات Levofloxacin و Gentamicin وبنسب 48 ٪ و40 ٪ بالتتابع.

الكلمات المفتاحية: الكليبسيلا الرئوية ، المجاري البولية ، الأنسان ، المضادات الحيوية.

Isolation and identification of *Klebsiella pneumoniae* bacteria from urinary tract infections in humans and study of their sensitivity to antibiotics

Hussam Majeed Mohammad ، Khalid Mahmood Hammadi
Al- Iraqia University / College of Education - Department of biology

Abstract :

This study aimed to isolate *Klebsiella pneumoniae* bacteria from urinary tract infections in human and study the sensitivity of this bacteria to different antibiotic . In this study, 100 urine samples were collected from human. The results of bacterial isolation from these samples reported 17 isolates of *Klebsiella pneumoniae* bacteria from human. These isolates were diagnosed through bacteriological culture on MaCconkey agar, blood agar medium, XLD and EMB, as well as biochemical tests, and finally the samples were fixed with Vitek_2 device to ensure their return to *Klebsiella pneumoniae.* An antibiotic sensitivity test was conducted for the isolated samples, where *Klebsiella pneumoniae* showed high resistance to Amoxicillin, Penicillin, Erythromycin and Amikacin at rates of 100%, 100%, 100% and 90%, respectively, while the resistance of bacteria to Ciprofloxacin, Cefotaxime and Tobramycin was relatively less, where it was 86% and 70% and 85%, respectively, while the bacteria were sensitive to levofloxacin and gentamicin at rates of 48% and 40%, respectively.

Key words: *Klebsiella pneumonia*, urinary tract , humans , antibiotics .

المقدمة

تنتمي بكتريا *Klebsiella Pneumonia* إلى العائلة المعوية Enterobacteriaceae وتعد هذه العائلة من المجاميع المهمة والشائعة وهي من العصيات السالبة لصبغة غرام اذ يكون الموطن الطبيعي لها القناة المعوية للإنسان والحيوان ، وان هذه العائلة واسعة الانتشار في الطبيعة فهي توجد في مختلف البيئات مثل التربة والمياه [1] ، وتتميز افراد هذه العائلة بقدرتها على النمو على الاوساط الزرعية الاعتيادية أي انها لا تحتاج الى الأوساط الزرعية المعقدة بحيث يمكن ان تنمو على أي وسط يحتوي على مصدر كاربوني واحد فضلاً عن كونها تنمو على أوساط زرعية تفريقيه مثل MacConkey agar و XLD agar و EMB [2]. كما تعد بكتريا *Klebsiella Pneumonia* من الممرضات الانتهازية Opportunistic Bacteria وهي اهم أنواع البكتريا التي تعود الى جنس الكليبسلا من الناحية الطبية [3] تتواجد هذه البكتريا في الانسان والحيوان اذ يمكنها ان تستعمر الانسجة الجسمية المختلفة كالجلد والبلعوم والمسالك البولية [4]; [5].

وتكمن خطورة هذه البكتريا في كونها ممكن ان تتسبب بحالات مرضية كثيرة للإنسان كالتهاب الرئة المكتسب Community-acquired Pneumoni-ae والتهابات المسالك البولية Urinary Tract In-fection وكذلك الانتان الدمي [6]. كما يمكن ان تتسبب بخراج الكبد Liver abscess وعادتا ما تصيب هذه البكتريا كبار السن وتحديدا الأشخاص الذين يعانون من امراض مستعصية كالسكري او امراض الجهاز التنفسي او مدمنو المشروبات الكحولية وذلك لضعف المناعة والدفاعات الجسمية لديهم ويمكن أيضاً أن تصيب الأطفال صغار السن أو الأطفال حديثي الولادة المرضى او أطفال الخدج المثبطين مناعيا [7]. تشير التقارير في الآونة الأخيرة إلى إن هذه البكتريا يمكن ان تتسبب بالعديد من الامراض إضافة الى امراض الجهاز التنفسي واهمها إصابات الجهاز البولي UTI اذ بين [8] إن بكتريا *K.Pneumoniae* تتسبب وبإحصائيات متزايدة حدوث التهابات المجاري البولية اذ يلاحظ حصول مجموعة من التغيرات الوظيفي. ان الاستعمال المتكرر للمضادات الحيوية ضد هذه البكتريا منذ اكثر من 70 عام أدى الى ظهور سلالات متطورة منها ومن ثم زادت مقاومتها ضد اغلب المضادات الحيوية الشائعة الاستعمال وبالتي فان هذه البكتريا أصبحت مشكلة عالمية في الطب الحديث [9] ، ونتيجة لذلك ظهرت الكليبسيلا الرئوية المقاومة للعديد من المضادات الحيوية Multidrug Resistant كمصدر رئيس لإصابات المستشفيات والاصابات المكتسبة في المجتمع وبالتي ارتفع معدل الامراضية والوفيات بهذه البكتريا بسبب محدودية خيارات العلاج بالمضادات الحيوية [10] .هدفت هذه الدراسة الى عزل بكتريا الكليبسيلا الرئوية من إصابات الجهاز البولي في الانسان ودراسة حساسية هذه العزلات للمضادات البكتيرية المختلفة

المواد وطرق العمل

جمع العينات :

جمعت 100 عينة إدرار من مرضى مستشفى الطارمية العام / بغداد لأشخاص يعانون من التهابات المجاري البولية ومن كلا الجنسين ، وثُبتت المواصفات للأشخاص الذين تم اخذ العينات منهم (حالة المريض الصحية، العمر، تكرار المرض، اخذ العلاج، مراجعة الأطباء) اذ كانت تؤخذ العينات من الادرار الوسطي وتوضع في انابيب نظيفة ومعقمة.

عزل وتشخيص البكتريا:

تم جمع عينات الادرار وضعت في انابيب نظيفة ومعقمة Plan tube وأجريت لها عملية الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة / دقيقة لمدة ثلاث دقائق ومن ثم جُمع الراسب لكل عينة لاستخدامه في عملية الزرع وتم تشخيص البكتريا وحسب [11]. وعلى أساس :

الخصائص الزرعية:

تم تشخيص مستعمرات بكتريا *Klebsiella pneumoniae* اعتمادا على الصفات المظهرية مثل شكل ولون المستعمرة حيث تم التشخيص بأخذ الراسب لكل عينه وزرعه على وسط الماكونكي لمعرفة قابلية البكتريا على تخمير سكر اللاكتوز وأيضاً تم زرع العينات على اكار الدم لمعرفة قابليتها على تحلل الدم من عدمه اذ تم زراعة العينات بطريقة التخطيط وحضنت بدرجة حرارة 37م^{0} لمدة 24 ساعة ومن ثم نقيت الى مستعمرات منفردة بعد ذلك تم اخذ المستعمرات المخمرة لسكر اللاكتوز والتي تكون مخاطية الشكل وغير محللة للدم على وسط اكار الدم وحفظت على وسط BHI (Brain-Heart infusion agar) والمحضر حسب تعليمات الشركة بدرجة حرارة 4م^{0}. اذ تم اهمال جميع العينات الغير مخمرة لسكر اللاكتوز على وسط الماكونكي وكذلك اهمال عينات البكتريا المحللة للدم على وسط اكار الدم .

الخصائص المجهرية :

تم تشخيص مستعمرات بكتريا *Klebsiella pneumoniae* اعتماداً على اختبارات مختلفة منها الفحوصات البايوكيميائية وفحوصات جهاز الفايتك (Vitek-2) وأيضاً صبغة غرام.

التحري عن مقاومة *Klebsiella pneumoniae* للمضادات الحيوية :

تم اختبار عزلات بكتريا *Klebsiella pneumonia* لتسعة مضادات حيوية من مجاميع مختلفة بطريقة انتشار القرص (Disc diffusion method) وفق ما جاء في [12] حيث نقلت 5-3 مستعمرات من العزلة النامية في وسط الماكونكي وبعمر 24-18 ساعة إلى انبوبة الاختبار الحاوية على 3 مل من المحلول الملحي الفسلجي، وتم ضبط كثافة العالق البكتيري مع انبوب 0.5 من مقياس العكورة ماكفرلاند الذي يعطي عدداً قدره حوالي (1 – 1.5 ×10^{8}) خلية/ مل، ثم غُمست المسحة القطنية swab Cotton في العالق البكتيري المحظر ومن ثم تم تدويرها وضغطها على الجدار الداخلي للأنبوبة لتقليل كمية اللقاح، بعد ذلك لقح طبق آكار مولر-هنتون بطريقة التخطيط بواسطة Swab على سطح الوسط بمختلف الاتجاهات للحصول على نمو متجانس، وتركت الاطباق حوالي 10 دقائق بحرارة المختبر لكي تجف. بعد ذلك وضعت اقراص المضادات الحيوية على سطح الوسط الملقح باستعمال ملقط معقم وضغطت بلطف لتثبيتها جيدا مع سطح الوسط وبمسافة لا تقل عن 20 ملم بين مركز قرص واخر ثم حضنت الاطباق الحاوية على أقراص المضادات الحيوية بدرجة حرارة 37م^{0} لمدة 24-18 ساعة ثم تمت قراءة النتيجة من خلال قياس منطقة التثبيط Inhibition Zoon بواسطة المسطرة بالمليلتر وتم مقارنتها مع القيم القياسية [13].

تم اختيار تسع مضادات من مختلف المجاميع وهي Amikacin (AK) وAmoxicillin (AX) و Cefotaxime (CTX) و Ciprofloxacin (CIP) و Erythromycin (E) و Penicillin (P) و Gentamicin (GEN) و Levofloxacin

(LE) و Tobramycin (TOB) .

النتائج Results

عزل وتشخيص بكتريا *Klebsiella pneumonia* :

تم جمع 100 عينة ادرار من الأنسان واظهرت نتائج العزل البكتيري لهذه العينات الحصول 17 عزلة من بكتريا الكليبسيلا الرئوية .

الصفات المظهرية والزرعية :

أظهرت نتائج العزل البكتيري لعينات الادرار التي جمعت من الانسان وجود بكتريا *K.Pneumoniae* اذ تمكنت من النمو على وسط الماكونكي الذي يعد وسطا تفريقي لكونه ينمي البكتريا السالبة لصبغة غرام وفي نفس الوقت يعد وسطا تفريقي بين البكتريا المخمرة لسكر اللاكتوز من غيرها اذ يعد مصدر كاربوني مهم لها (Atlas et al.,1995)، وقد تميزت مستعمرات بكتريا *K.Pneumoniae* على هذا الوسط بكبر حجمها وبلونها الوردي البراق وبقوامها المخاطي وهي الصفة المميزة لها ، اما مستعمراتها على وسط اكار الدم فقد كانت شفافة لماعة مع عدم قدرتها على تحليل الدم في حين ظهرت مستعمرات هذه البكتريا على وسط EMB محدبة ملساء ذات نهايات واضحة بلون وردي غامق الى ارجواني اما مستعمراتها على وسط (XLD) (Xylose Lysine Deoxycholate agar) فقد كانت ملساء كبيرة معتمة صفراء اللون وجميع هذه الصفات تتفق مع المواصفات العامة لمستعمراتها التي تم ذكرها في [11].

التشخيص المجهري:

لقد بينت نتائج الفحص المجهري للعزلات البكتيرية المأخوذة من عينات ادرار الأنسان بعد تحضير الشرائح المجهرية انها بكتريا سالبة لصبغة غرام وتظهر بشكل عصيات مستقيمة قصيرة وأحيانا تظهر بشكل ثنائيات مفردة او مزدوجة ذات نهايات مدورة قصيرة وردية اللون كونها سالبة لصبغة غرام وهذا يتفق مع ما بينه [14] .

الفحوصات البايوكيمياويه :

لقد أعطت بكتريا *K.Pneumoniae* النتائج المبينة في الجدول (1) لبعض الفحوصات البيوكيماوية التي اجريت.

جدول (1) نتائج الفحوصات البايوكيمائية

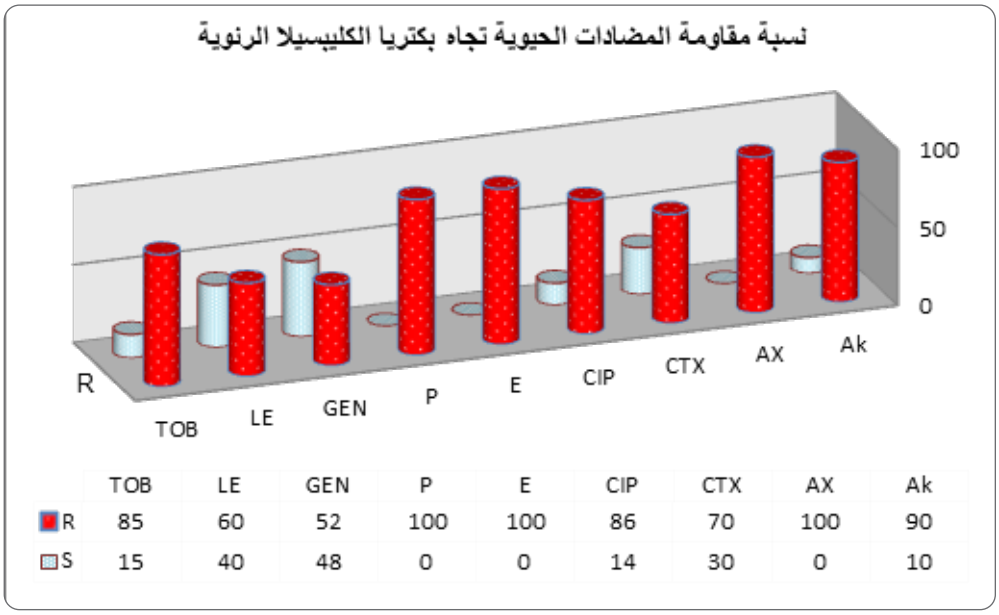
الفحص	Catalase	Oxidase	Indole	M.R	TSI	Movement
النتيجة	+	-	-	-	Y/Y/Y .Co_2 P -	-

اذ انها أعطت نتيجة موجبة لفحص الكاتاليز وهذا يدل على ان هذه البكتريا هي بكتريا هوائية كون إن معظم أنواع البكتريا الهوائية تعطي نتيجة موجبة لهذا الفحص اما فحص الأوكسيديز فقد اعطى نتيجة سالبة اما في اختبار تكون الاندول فقد أدى الى تكون حلقة صفراء وهو أيضا يدل على سلبية الفحص وكذلك فحص المثيل الأحمر اعطى أيضا نتيجة سالبة، اما فحص قدرة البكتريا على تخمير السكريات فقد أظهرت النتائج قدرة هذه البكتريا على تخمير سكر اللاكتوز والكلوكوز والسكروز وإنتاج غاز CO_2 وعدم قدرتها على انتاج

غاز H_2S في حين أعطت نتائج فحص الحركة نتيجة سالبة أي ان هذه البكتريا غير قادرة على الحركة وهذه النتائج تتفق مع ما جاء في[11].

اختبار فحص الحساسية للمضادات الحيوية :

وقد أظهرت نتائج فحص حساسية المضادات نسب متفاوتة في هذه الدراسة وذلك حسب الشكل (1):



	TOB	LE	GEN	P	E	CIP	CTX	AX	Ak
R	85	60	52	100	100	86	70	100	90
S	15	40	48	0	0	14	30	0	10

الشكل (1) مخطط يوضح نسبة مقاومة المضادات الحيوية تجاه عزلات بكتريا الكليبسيلا الرئوية حيث تمثل R (Resistant) مقاومة البكتريا و S (Sensitivity) تحسس البكتريا للمضاد الحيوي.

اختبار فحص الحساسية للمضادات :

أظهرت عزلات بكتريا *K.Pneumoniae* مقاومة عالية تجاه كل من Amikacin و-Amoxicillin و Erythromycin و Penicillin اذ كانت نسبة المقاومة بالنسبة لمضاد Amikacin هي 90 ٪ ولبقية المضادات هي 100 ٪ وهذه النسبة تتفق مع دراسات سابقة أجرتها الباحثة [15] والباحثة [16] اذ بلغت نسبة المقاومة في هذه الدراسات تجاه هذه المضادات هي 100 ٪على التوالي ويعود السبب في هذه المقاومة الى الاستعمال المتكرر لهذه المضادات منذ عشرات السنين، كما ان هذه النسب اختلفت عن دراسات أخرى اجرتها الباحثتان [17] و [18] اذ بلغت نسبة مقاومة بكتريا K. Pneumoniae تجاه مضاد Amikacin فيها 63 ٪ و33.3 ٪ على التتابع.

اما مضادات Ciprofloxacin و Tobramycin فقد أظهرت بكتريا *K.Pneumoniae* مقاومة تجاه هذه المضادات بنسبة 86 ٪ و8 ٪ على التتابع وهي نسبة متوافق مع دراسة [17] اذ كانت نسبة المقاومة في هذه الدراسة تجاه هذه المضادات هي 83.3 و83 على التتابع ، كما انها اختلفت عن دراسة [18] التي بلغت نسبة مقاومة مضاد Ciprofloxacin فيها 38 ٪ اما مضاد Cefotaxime فقد كانت نسبة مقاومة البكتريا تجاهه هي 70 ٪ وهي نسبة متقاربة مع دراسة الباحثة [19] التي بلغت نسبة المقاومة فيها 66.6 ٪ واختلفت عن دراسات الباحثتان [15] و[17] اذ بلغت النسبة 100 ٪ على التتابع.

في حين أبدت البكتريا اقل مقاومة تجاه المضادات Levofloxacin و Gentamicin اذ كانت النسب 60 ٪ و52 ٪ على التتابع وهي تتفق مع دراسة الباحثة [15] التي كانت نسبة مقاومة مضاد Levofloxacin فيها 66.7 وكذلك تتفق مع دراسة الباحثة [17] حيث كانت نسبة المقاومة تجاه مضاد Gentamicin فيها 50 ٪.

نستنتج من هذه الدراسة ان بكتريا الكليبسيلا الرئوية تشكل نسبة كبيرة من مسببات واصابات الجهاز البولي كما أبدت مقاومة عالية تجاه بعض المضادات الحيوية الشائعة الاستخدام كمضادات Amoxicillin و Penicillin و Erythromycin و Amikacin.

References.

1-Martin, R. M. and Bachman, M. A. (2018). Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. Front. Cell. Infect.Microbiol.8 (4):1-15

2-Brooks .G.F; Carroll .K.C; Butel .J.S; Morse .S .A; Mietzner. T.A.(2010). Medicalmicrobiology,Jawetz,Melnick andAdelbergs.25th.Edition.McGraw-Hill Companies, Printed in USA ,213-219.

3-Brisse S, Fever C, Passet V, Issenhuth_ Jeanjean S, Tournebize R, diancourt L. and Grimont P. (2009). Virulent Clones of *Klebsiella pneumoniae*: Identification and Evolutionary Scenario based on Genomic and Phenotypic Characterization. J. PloS ONE.; V4 (3):

4-Surgers, L. ; Boyd, A. ; Girard, P.M. ; Arlet, G. and Decré, D. (2016). ESBL-Producing Strain of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* K2, France. Emerg. Infect. Dis. 22(9): 1687–688.

5-Vasaikar, S.; Obi, L.; Morobe, I. and Bisi-Johnson, M. (2017). Molecular characteristics and antibiotic resistance profiles of *Klebsiella* isolates in Mthatha, Eastern Cape Province, South Africa. Int. J. Microbiol. 42: 1-7.

6-Lee, C.R.; Lee , J.H.; Park, K.S.; Jeon, 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 front. Cell. Infect. Microbial. 7 (483):1_13.

7-Umaeh, O.; Berkowitz, L.; shepp, D.; Talavera, F.; King, J.; Mylonakia, E. and cunha, B. (2006). Infectious disease, *Klebsiella* infection. J. Med. 27(1).

8-Jenney, A. W.; Clements, A; Far, J. L.; Wijburg, O. L.; A.; Mc Glinche Spelman, D.W.; Navon-Venezia, S.; Kondratyeva, K. and Carattoli, A. (2017). *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. FEMS Micrbiol. Rev.41(3):252-275.

9-Navon-Venezia, S.; Kondratyeva, K. and Carattoli, A. (2017). *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. FEMS Micrbiol.Rev.41(3):252-275.

10-Watkins, R.R. and Bonomo, R.A.(2016). Overview: global and local impact of antibiotic resistance. Infect. Dis. Clin. North Am.30 (2):313 -322.

11-Quinn, P. J.; Markey, B. K.; Carter, M. E.; Donnelly, W. J. and Leonard,

F. C. (2004). Veterinary Microbiology and Microbial Diseases. 1st Ed., Blackwell Science Ltd.: 225.

12-Bauer, A. W.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J. C. and Truck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol., 43:493-496.

13-NCCLS. (2000). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard, 7th ed. NCCLS document M2-A7. NCCLS, Wayne, Pa.

14-Forbes, B.A.; Daniel, F.S. and Alice, S.W. (2007). diagnostic microbiology. 12th. ed., Mosby Elsevier company, USA. 200-211.

المصادر العربية ..

15- **قادر، روزكار أنور.** (2018). التحري عن حساسية الجراثيم المعزولة من إدرار مرضى الفشل الكلوي في مدينة كركوك لبعض المضادات الحيوية وتأثير مستخلصات شنا شيل الذرة عليها. رسالة ماجستير/ كلية العلوم جامعة كركوك.

16- **حميد، تقى عبد الكريم.** (2013). دراسة مقارنة للمحتوى البلازمي دي للبكتريا المخمرة لسكر اللاكتوز التابعة للعائلة المعوية والمعزولة من عينات بيئية وسريرية. رسالة ماجستير/ كلية التربية للعلوم الصرفة -ابن الهيثم / جامعة بغداد.

17- **نيال، دانية.** (2016). تقصّي بعض الأنواع الجرثومية المسبّبة للإنتانات القيحيّة ودراسة حساسيتها تجاه المضادات الحيوية. رسالة ماجستير/ كلية العلوم / جامعة حلب.

18- **دخيل، خلود حامد.** (2009). عزل وتشخيص بعض الأنواع البكتيرية المرافقة لالتهابات المجاري البولية عند النساء الحوامل المصابات بالسكري Type 2 ومقاومتها لبعض المضادات الحيوية. مجلة الهندسة والتكنولوجيا، المجلد 27، العدد16.

19- **حمدي، نغم معد.** (2016). عزل وتشخيص بكتريا *Klebsiella. SPP* من مواقع بيئية مختلفة واجراء دراسة مقارنة لحساسية العزلات تجاه المضادات الحيوية. مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة. المجلد العاشر. العدد الأول.