جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة الموصل / كلية العلوم

قسم علوم الحياة

دراسة بكتريولوجية وجزيئية لبكتيريا الكليبسيلا الرئوية المعزولة من مصادر سريرية مختلفة والدور التثبيطي لمركب N-acetyl L-cysteine

شيماء تحسين أحمد عبد القادر

رسالة ماجستير

علوم الحياة / أحياء مجهرية

إشراف

الأستاذ المساعد

الدكتور شاكر غازي جرجيس

1446هـ

2024 م

الخلاصة

هدفت الدراسة الى عزل وتشخيص بكتريا الكلبسيلا الرئوية بالاعتماد على الخصائص البايوكيميائية والجزيئية من مصادر سريرية مختلفة ودراسة عوامل ضراوتها مضهريا وجزيئيا وتحديد مقاومة البكتريا تجاه المضادات الحيوية وقدرة بكتريا الكلبسيلا الرئوية على انتاج انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف والمعدنية واستخدام مادة N-acetyl L-cysteine كمادة مثبطة لنمو البكتريا و مثبطة لتكوين الغشاء الحيوي . حيث تم جمع 186 عينة سريرية مختلفة من المرضى الراقدين في مستشفيات مدينة الموصل(مستشفى ابن سينا – مستشفى ابن الاثير – مستشفى الموصل العام) للفترة من شهر حزيران 2023 لغاية تشرين الاول 2023 ولكلا الجنسين وبمختلف الأعمار شملت 75 عينة إدرار و46 عينة سائل النخاع الشوكي و23 عينة قشع و16 عينة دم و9 عينات من سوائل الجسم و6 عينات من إلتهاب القصبات الهوائية و4 عينات خروج و2 عينة لكل من القسطرة، الجروح، نخاع العظم وعينة واحدة من الحروق.

أظهرت نتائج التشخيص الزرعي والمظهري والفحوصات الكيموحيوية وتأكيد التشخيص باستخدام نظامي API20E Vitek2 system والتشخيص الجزيئي باستخدام الجين 16S rRNA عائدية 23 عزلة الى النوع *Klebsiella pneumoniae* ,كما بينت النتائج أنَّ أكثر العزلات تم تشخيصها من الإدرار إذ بلغ عدد العزلات 12 عزلة وبنسبة 6.45 % تلتها عينات سائل النخاع الشوكي 3 عزلات بنسبة 1.6 %.

دُرست حساسية ومقاومة العزلات البكتيرية تجاه 11 مضاداً حيوياً إذ بينت النتائج تفاوتاً في نسبة مقاومة العزلات لهذه المضادات، إذ كانت أعلى نسبة مقاومة لمضادات الببراسيلين وبنسبة 95.6% ومن ثم الأمبسيلين وبنسبة 86.9 % بينما كانت حساسة المضادين الحيويين الأميبينيم والميروبينيم بنسبة 78.26%.

اظهرت النتائج امتلاك العزلات لانزيمات البيتالاكتاميز بالطريقة الحامضية بنسبة 100% والمعدنية بنسبة 100% اما انتاج أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف بنسبة 60.8%.

أوضحت نتائج التحري عن عوامل الضراوة أنَّ جميع عزلات بكتريا *Klebsiella pneumoniae* كانت حاوية على المحفظة وغير منتجة لأنزيم الهيمولايسين بينما أظهرت قابليتها على انتاج الغشاء الحيوي إذ وبينت النتائج قدرة البكتريا على انتاج الغشاء الحيوي بصورة قوية بطريقة الانبوب وبنسبة 76% بينما في طريقة الصفيحة المعيارية كانت نسبة انتاج الغشاء الحيوي بصورة قوية بنسبة 52.1%وتم الكشف عن انتاج الطبقة الغروية Slime layer بطريقة الكونغو الأحمر واظهرت النتيجة انها منتجة للطبقة الغروية بواقع 19 عزلة (82.6%) . أظهرت النتائج أنَّ العزلات البكتيرية كانت منتجة للانزيم بواقع 95.65% وتم التحري عن انتاج حاملات الحديد إذ بينت الدراسة أنَّ جميع العزلات منتجة لحاملات

الحديد واظهرت امتلاكها لأنزيمات البروتينيز اللأيبيز والليسيثينيز والجيلاتينيز وبنسب 8.69%، 13.04%، 4.34%، 8.69% على التوالي. كما اظهرت جميع العزلات قابليتها الثبات البكتيري بنسبة 100%. واظهرت جميع العزلات عدم انتاجها للخيط اي عدم امتلاكها لصفة فرط اللزوجة اي انها تعود للنمط الكلاسيكي.

تم التحري عن الجينات المشفرة لعوامل الضراوة *rmpA*, *wabG*, *fimH*, *wzi* إذ تم انتخاب 11 عزلة بكتيرية فقط للكشف عن عوامل الضراوة. تواجد الجين *wzi* المسؤول عن تكوين المحفظة وبنسبة 100% كذلك الجين المسؤول عن الالتصاق *fimH* والجين *wabG* الذي يشارك في تكوين متعدد السكريات LPS إذ بينت النتائج تواجد الجينات وبنسبة 100%، بينما الجين *rmpA* المرتبط بفرط اللزوجة والمخاطية لم تظهر أي بكتريا إحتوائها على هذا الجين.

كما تم التحري عن الجينات المقاومة للمضادات الحيوية جزيئيا بالكشف عن الجينين bla_{IMP},bla_{TEM} إذ تم الكشف عن تواجد الجين bla_{TEM} وبواقع 100% بينما الجين bla_{IMP} لم يعطي أي نتيجة وكانت العزلات خالية من هذا الجين.

تم التحري عن الفعالية التثبيطية لمادة الـ NAC (N-acetylal L-cysteine) اتجاه بعض العزلات بطريقة الحفر واظهرت النتائج امتلاكها فعالية تثبيطية بقيم مختلفة إذ تراوحت اقطار التثبيط مابين 8–20 ملم حسب نوع العزلات.

كما دُرس تاثير مادة NAC على تكوين الغشاء الحيوي بطريقة السلايد إذ تم استخدام 10 ملغم/مل بنسبة اقل وتركيز 80 ملغم/مل كان مثبطاً لتكوين الغشاء الحيوي بشكل كامل في حين تم الكشف عن قدرة مادة NAC في تثبيط تكوين الغشاء الحيوي بطريقة الصفيحة المعيارية إذ أظهرت هذه الطريقة تثبيط انتاج الغشاء الحيوي وبنسبة متفاوتة.

أثبتت مادة الNAC في دراستنا بأنها خيار علاجي حيث استطاعت المادة من ازالت صفة الثباتية بتراكيز مختلفة وكذلك تم التحري عن السمية الخلوية للمادة على البكتريا. وهناك دراسات بينت سلامة وعدم سمية المادة للعلاج داخل جسم الانسان وذلك من خلال استخدامها عن طريق الوريد في علاج مرضى حالات سريرية مختلفة ولهذا فإن نتائج دراستنا تدعم استخدام مادة ال NAC بتراكيز محددة لعلاج الاصابات البكتيريا التي تسببها البكتريا المقاومة او ذات المقاومة للمضادات الحيوية .

يوضح هذا العمل لاول مرة محليا التأثير التثبيطي لل NAC على نمو الكلبسيلا ويتوجب اجراء المزيد من التجارب لدراسة الية هذا التأثير .

Abstract

The study aimed to isolate and identify Klebsiella pneumoniae bacteria based on biochemical and molecular characteristics from various clinical sources. It also sought to investigate their virulence factors both phenotypically and molecularly, determine their antibiotic resistance, and assess their ability to produce extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) and metallo-beta-lactamases (MBLs). Additionally, the study evaluated the use of N-acetyl L-cysteine as an inhibitor of bacterial growth and biofilm formation.

A total of 186 clinical samples were collected from hospitalized patients in Mosul city hospitals (Ibn Sina Hospital, Ibn Al-Atheer Hospital, and Mosul General Hospital) during the period from June 2023 to October 2023. The samples were obtained from both genders and various age groups. The collected samples included 75 urine samples, 46 cerebrospinal fluid samples, 23 sputum samples, 16 blood samples, 9 body fluid samples, 6 bronchitis samples, 4 stool samples, 2 catheter samples, 2 wound samples, 2 bone marrow samples, and 1 burn sample.

The results of cultural, morphological, and biochemical tests, along with confirmation using the API 20E and Vitek 2 systems, as well as molecular identification based on the 16S rRNA gene, confirmed that 23 isolates belonged to the species Klebsiella pneumoniae.

The results also indicated that most isolates were obtained from urine samples, with 12 isolates accounting for 6.45%, followed by cerebrospinal fluid samples, with 3 isolates representing 1.6%.

The susceptibility and resistance of the bacterial isolates to 11 antibiotics were studied. The results revealed variations in the resistance rates among the isolates. The highest resistance was observed against piperacillin at 95.6%, followed by ampicillin at 86.9%. In contrast, the isolates showed higher sensitivity to imipenem and meropenem, with a rate of 78.26%.

The findings also demonstrated that all isolates produced beta-lactamase enzymes, with 100% positivity for both acidic beta-lactamases and metallo-beta-lactamases. Additionally, 60.8% of the isolates produced extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs).

The results of virulence factor detection showed that all Klebsiella pneumoniae isolates contained capsules and were non-producers of the hemolysin enzyme. However, they demonstrated the ability to produce biofilm, with 76% of the isolates exhibiting strong biofilm production using the tube method.

In the standard plate method, the percentage of strong biofilm production was 52.1%. The production of the slime layer was detected using the Congo red method, and the results showed that 19 isolates (82.6%) were positive for slime layer production.

The production of the urease enzyme was detected, and the results showed that 95.65% of the bacterial isolates were urease producers. The production of siderophores was also investigated, and the study revealed that all isolates were positive for siderophore production. Furthermore, the isolates exhibited the presence of protease, lipase, lecithinase, and gelatinase enzymes at percentages of 8.69%, 13.04%, 4.34%, and 8.69%, respectively.

All isolates demonstrated 100% bacterial stability. Moreover, none of the isolates produced a string, indicating the absence of hypermucoviscosity, thus classifying them as belonging to the classical type.

The virulence-associated genes rmpA, wabG, fimH, and wzi were investigated, with only 11 bacterial isolates selected for virulence gene detection. The wzi gene, responsible for capsule formation, was present in 100% of the isolates, as well as the fimH gene, which is involved in adhesion, and the wabG gene, which participates in the formation of lipopolysaccharides (LPS). The results showed that these genes were detected in 100% of the isolates. However, the rmpA gene, associated with hypermucoviscosity, was not detected in any of the isolates.

Antibiotic resistance genes were also investigated molecularly by detecting the blaIMP and blaTEM genes.

The results revealed that the blaTEM gene was present in 100% of the isolates, whereas the blaIMP gene showed no results, indicating that the isolates were free of this gene.

The inhibitory activity of NAC (N-acetyl-L-cysteine) against some isolates was investigated using the well diffusion method. The results demonstrated that NAC exhibited inhibitory activity with varying inhibition zone diameters, ranging from 8 to 20 mm, depending on the type of isolates.

The effect of NAC (N-acetyl-L-cysteine) on biofilm formation was also studied using the slide method. A concentration of 10 mg/mL showed partial inhibition, while a higher concentration of 80 mg/mL completely inhibited biofilm formation. Furthermore, the ability of NAC to inhibit biofilm formation was assessed using the standard plate method, which demonstrated varying degrees of biofilm inhibition.

In our study, NAC proved to be a potential therapeutic option, as it was able to eliminate bacterial stability at different concentrations. The cytotoxicity of NAC on bacteria was also evaluated. Previous studies have shown that NAC is safe and non-toxic for therapeutic use in humans, especially when administered intravenously for treating various clinical conditions.

Therefore, our findings support the use of NAC at specific concentrations as a treatment option for infections caused by antibiotic-resistant or multidrug-resistant bacteria.

This study is the first to locally report the inhibitory effect of NAC on the growth of Klebsiella. Further studies are required to investigate the mechanism of this effect.

The Republic of Iraq
Ministry of Higher Education and
Scientific Research
University of Mosul / College of Science
Department of biology

Bacteriological and Molecular Study of Klebsiella Pneumoniae Isolated from Different Clinical Sources and The Inhibitory Role of N-acetyl L-cysteine

Shaima Tahseen Ahmed Abdel Qader

M.Sc. /Thesis

Biology / Microbiology

Supervised by

Assistant Prof. Dr. Shakir Ghazi Gergees

2024 A.D. **1446 A.H**