استمارة مستخلصات رسائل الماجستير والدكتوراه في جامعة البصرة

الكلية : كلية العلوم **اسم الطالب: سعد شاكر مهدي احمد**

القسم: علوم الحياه **اسم المشرف: 1. أ.د.سندس صديق بكر ، 2. أ.د.لمياء مصطفى النعمه**

التخصص: فسلجة احياء مجهرية **الشهادة: الدكتوراه**

عنوان الرسالة:

التوصيف الفسلجي ، المظهري والجزيئي ل- *Klebsiella pneumonia* متعددة المقاومة والمنتجة بيتا لاكتميز واسع الطيف (ESBLs) والمعزولة من الاطفال الرضع في وحدة العناية المركزة في مستشفيات مدينة البصرة

ملخص الرسالة أو الأطروحة:

شملت الدراسة الحالية جمع (400) عينة دم من الاطفال الخدج المتوقع اصابتهم بالانتان الدموي المتاخر (late onset sepsis) والذين تراوحت اعمارهم بين (7-28) يوما للفتره من نيسان 2012 الى شباط 2013 ، استخدمت مزارع الدم للتحري عن وجود البكتريا في دم المرضى .

اوضحت نتائج العزل الجرثومي عزل 58 (14.5 %) عزلة بكترية توزعت بعد تشخيصها باستخدام بعض الاختبارات البايوكيميائية التفريقية الى 23 (39.7 %) *Pseudomonas species*، 19 (32.8 %) *Klebsiella species* ، 8 (13.8 %) *Enterobacters species*، 5 (8.6 %) *Citrobacters species* و 3 (5.1 %) *Escherichia coli* . شخصت (19) عزلة من *Klebsiella species* على انها تعود *Klebsiella pneumoniae* باستخدام (19) اختبار بايو كيميائي واستخدام API 20E kit . كما واظهرت الدراسة توزع الـ(17) عزلة من *Klebsiella pneumoniae* على تسع سلالات بكترية من *Klebsiella pneumoniae* هي (NBRC 14443 , BY6,TO2,KP1513,KLP,CICR-GV4,YC-A42 and CPBPPZ) بينما سلالاتين من بكتريا *Klebsiella pneumonia* العزلات المرقمه (3 و 52) تمتلك طفرات مختلفة العدد والانواع مقارنه بالعزلات القياسية . سجلت هذه العزلات كعزلات جديده وسميت ثم نشرت في البنك الجيني العالمي والبنك الاوربي National Center for Biotechnology information (NCBI) and European Nucleotide Archive (ENA) تحت اسم SaaSLT1 *Klebseilla pneumoniae* strain (GenBank:KP240606.1) و*Klebseilla pneumoniae* SaaSLT2 (GenBank:KP240607.1) .

تم التحري عن قابلية *Klebsiella pneumoniae* على انتاج انزيم البيتالاكتميز واسع الطيف (extended-spectrum β-lactamases (ESBLs)) باستخدام اربعة طرق هي (double disk synergy test , double disk approximate method , E test and brilliance ESBL medium) . اظهرت نتائج التحري عن انتاج انزيم البيتالاكتميز واسع الطيف لعزلات Klebsiella pneumonia باستخدام طريقة (double disk synergy test) ان 18 (94.7 %) منتجة للـ ESBL ضد aztreonam، 17 (89.5 %) منتجة للـ ESBL ضد cefotaxime ، 6 (32 %) منتجة للـ ESBL ضد ceftriaxone و 3 (16 %) منتجة للـ ESBL ضد ceftazidime مع وجود فرق معنوي عالي عند مستوى احتمالية (P<0.01) . بينما كانت نتائج التحري عن انتاج الـ ESBL باستخدام طريقة (double disk approximate method) ان 19 (100 %) عزلة منتجة للـ ESBL ضد cefotaxime ، 14 (74 %) منتجة للـ ESBL ضد ceftriaxone ، 18 (94.7 %) منتجة للـ ESBL ضد ceftazidime و 19 (100 %) منتجة للـ ESBL ضد aztreonam مع وجود فرق معنوي عند مستوى احتمالية (P<0.05). لكن استخدام طريقة (Etest) للتحري عن انتاج الـ ESBL ، اظهرت ان 17 (89.5 %) من العزلات المنتجة للـ ESBL ضد cefotraxime / cefotraxime + clavulonic acid strip . بينما 13 (68 %) من العزلات المنتجة للـ ESBL ضد ceftazidime/ceftazidime+ clavulonic acid strip .واظهر استخدام وسط الـ brilliance ESBL medium اعطى نتائج موجبة لانتاج الـ ESBL لجميع العزلات .

استخدمت تقنية سلسلة التفاعلات المبلمره الـ (PCR) للكشف عن بلازميدات المقاومة لكل من البلازميد bla_{TEM} و البلازميد bla_{SHV} والمسؤولة عن انتاج الـ ESBL في بكتريا الـ Klebsiella pneumonia المشخصة بالدراسة الحالية . اظهرت نتاج الترحيل في هلام الاكاروز ان جميع العزلات قيد الدراسة تمتلك البلازميد bla_{TEM} و البلازميد bla_{SHV} .استخدمت تقنية الـ (16SrDNA) لتشخيص انواع bla_{TEM} و bla_{SHV} المنتشرة بين العزلات قيد الدراسة وتم التحري عن الطفرات المتواجدة في انواع الـ bla_{TEM} و bla_{SHV} عن طريق استخدام سكونس البلازميدات وترجمته باستخدام برامج ترجمة البروتين والمقارنه مع البروتينات الخاصة لكل من البلازميد bla_{TEM} و البلازميد bla_{SHV} . اظهرت نتائج الدراسة عن تشخيص ست انواع من bla_{SHV} . هي (SHV-1, SHV-7, SHV-11, SHV-77, SHV-151 and SHV-163) بينما تم تشخيص 19 بلازميد جديد من الـ bla_{TEM} في هذه الدراسة توزعت على خمس مجاميع تمتلك طفرات مختلفة العدد والانواع مقارنه مع البروتينات الخاصه للبلازميد bla_{TEM}. سجلت هذه البلازميدات كانواع جديده وسميت ثم نشرت في البنك الجيني العالمي والبنك الاوربي National Center for Biotechnology information (NCBI) and European Nucleotide Archive (ENA) تحت اسم . SSLT1 plasmids (GenBank:KP240601.1), SSLT2 plasmids (GenBank:KP240602.1) و SSLT3 plasmids (GenBank:KP240603.1) و SSLT4 plasmids (GenBank:KP240604.1) و SSLT5 plasmids (GenBank:KP240605.1) .

كما وتضمنت الدراسة الحاليةدراسة قابلية تكوين البايوفيلم باستخدام الطرق الكمية (tube method) والطرق النوعية (tube method and microtitre-plate method) ومقارنتها مع قابلية تكوين البايوفيلم مع تقييم منحنى النمو للعزلات قيد الدراسة .اظهرت نتائج الدراسة ان جميع العزلات لها القابلية على تكوين البايوفيلم وان افضل وقت للحضن هو (72h and 96h) مع وجود فرق معنوي عالي عند مستوى احتمالية (P<0.01) وان هناك علاقة طردية مابين القدرة على تكوين البايوفيلم مع منحنى النمو للعزلات قيد الدراسة .

College: Science **Name of Student: Saad Shakir Mahdi**

Dept.: Biology **Name of supervisor: 1. Prof. Dr. Sundus S. Bakr**

2. Prof. Dr. Lamia M. Al-Naama

Specialization: Microbial Physiology **Certificate: Doctor of Philosophy**

Title of Thesis:

Physiologic, phenotypic and molecular characterization of multi-drugs resistant (MDR) extended-spectrum β-lactamases (ESBLs) producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from hospitalized neonates in intensive care units in Basra city

Abstract of Thesis:

The current study included the collection of (400) blood samples from neonates predictably diagnosed as late onset sepsis patients, ranged from (7-28) days, for the period from April (2012) to February (2013). Blood cultures were used For detection of bacteria in the blood .

Results of bacterial isolate by using some differential biochemical tests were showed 58(14.5%) bacterial isolates, that distributed to 23(13.8%) *Pseudomonase* species , 19(32.8%) *Klebsiella* species , 8(13.8%) Enterobacters species ,5(8.6%) Citrobacters species and 3(5.1%) Escherichia coli . (19) isolate Diagnosed as *Klebseilla species* returning to *K.pneumoniae* species by using (19) biochemical test and API 20E kit , current study also showed the distribution the (17) isolates from *K.pneumoniae* into nine strains NBRC14443,TM2,BY6,TO2,KP1513,KLP,CICR-GV4,YC-A42 and CPBPPZ) ,while the two strains from *K.pneumoniae* isolates (No.3 and No.52) have different types and number of mutations according to their sequence compared with their reference strains . Theses isolates were reported as new global separated strain and published by the National Center for Biotechnology information (NCBI) and European Nucleotide Archive (ENA) , then databases of these strain were recorded in the GenBank as *Klebseilla pneumoniae* SaaSLT1 strain under accession number (KP240606.1) and *Klebseilla pneumoniae* SaaSLT2 strain under accession number (KP240607.1) respectively.

The detection ability of *K.pneumoniae* isolates for producing the extended spectrum β-lactamase enzymes (ESBLs) by using four methods (double disk synergy test , double disk approximate methods , E test and brilliance ESBL medium . Results were showed the detect of extended spectrum β-lactamase (ESBL) *K.pneumoniae* isolates by using double disk synergy test that 18(94.7%) producing EABL against Aztreonam ,17(89.5%) against cefotaxime, 6(32%) against ceftriaxone and 3(16%) against ceftazidime ,with a high significant difference at the level of probability ($P<0.01$) . While the results of the detected of the production ESBL by using double disk approximate methods that 19(100%) isolates producing ESBL against cefotaxime , 14(74%) against ceftriaxone , 18(94.7%) against ceftazidime and 19(100%) against cefotaxime Aztreonam with a significant difference at the level of probability ($P<0.05$). But using the Etest methods that investigation of the production ESBL showed 17(89.5%) from isolates production ESBL against cefotraxime / cefotraxime + clavulonic acid strip where as 13(68%) from isolates production ESBL against ceftazidime/ceftazidime+ clavulonic acid strip .while the used the brilliance ESBL medium give positive result for all 19 isolates as production ESBL .

The polymerase chain reaction technique (PCR) was used for the detection of resistance plasmids for each of the bla_{TEM} and bla_{SHV} responsible for the production of extended spectrum β-lctamase in *K.pneumoniae* diagnosed in the current study . Results of migration in agarose gel showed the that all isolates under study possessed plasmid type bla_{TEM} and plasmid type bla_{SHV} .The 16SrDNA technique was used to diagnose types of bla_{TEM} and bla_{SHV} scattered among the isolates under study and investigation of the mutations found in types of bla_{TEM} and bla_{SHV} through the use of plasmids sequences and translation programs using the protein translation and comparison with standard proteins of each of bla_{TEM} and bla_{SHV} plasmids . The results showed diagnosis of six types of bla_{SHV} (SHV-1, SHV-7, SHV-11, SHV-77, SHV-151 and SHV-163). While in this study diagnosis of (19) new plasmids from bla_{TEM} distribution in five groups have different types and number of mutations according to their sequence compared with their reference proteins . Theses plasmids were reported as new global separated plasmids and published by the National Center for Biotechnology information (NCBI) and European Nucleotide Archive (ENA) , then databases of these plasmids were recorded in the GenBank as SSLT1 plasmids under accession number (KP240601.1), SSLT2 plasmids under accession number (KP240602.1) , SSLT3 plasmids under accession number (KP240603.1), SSLT4 plasmids under accession number (KP240604.1) and SSLT5 plasmids under accession number (KP240605.1) respectively .

Also the current study included the studying of ability the isoletes to forming biofilm by using quantitative method (tube method) and qualitative methods by using the(tube method and microtitre-plate method) and compared with the portability forming of biofilm by studying the Curve growth of isolates . The study results showed that all isolates have the ability to forming the biofilm and the suitable incubation time is (72h and 96h) with a high significant difference at the level of probability ($P<0.01$) and there is an extrusive correlation between the ability to formation biofilm with the growth curve of the isolates under study.