مجلة جامعة بابل / العلوم الصرفة والتطبيقية / العدد (٢) / المجلد (٢٢) : ٢٠١٤

دراسة النسق البلازميدي للمتقلبات المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية

حسن فاضل ناجي خالد عبد الكاظم الطائي

جامعة بابل / كلية العلوم / قسم علوم الحياة

الخلاصة

تم عزل وتشخيص ٤٢ عزلة من بكتريا المتقلبات. تضمنت ٣٨عزلة (٩٠.٤٨%) لبكتريا *Proteus mirabilis* و٤ عزلات (٩.٥٢ %) لبكتريا *P. vulgaris* . اختبرت حساسية العزلات تجاه ١٨ مضادا حيويا ، اذ ابدت عزلات الاغشية الحيوية مقاومة متعددة للمضادات الحيوية مقارنة بعزلات الادرار. تم التحري عن النسق البلازميدي لاربع من عزلات الاغشية الحيوية وثلاث من عزلات الادرار عائدة للنوع *P. mirabilis* وعزلتان للنوع *P. vulgaris* واحدة من عزلات الاغشية الحيوية والاخرى من عزلات الادرار. كانت جميعها متشابهة في نسقها البلازميدي ، اذ احتوت على بلازميد واحد صغير ذو حجم مقارب لحجم البلازميد pBR322. أظهرت نتائج تجارب التحول الوراثي أن بلازميدات بكتريا المتقلبات لها القدرة على التعبير المظهري في بكتريا *Escherichia coli* MM294 وأنها ذات مدى مضيفي واسع ، وإن الجينات المسؤلة عن مقاومة مضادات الامبسلين والتتراسايكلين والكلورومفينكول والكوترايمكسازول محمولة على تلك البلازميدات.

Abstract

A total of forty two *Proteus* isolates were isolated and identification. These were included 38 isolates (90.48%) of *P. mirabilis* and 4 isolates (9.52%) of *P. vulgaris*. The antibiotics sensitivity of the isolates were tested against 18 of antibiotics. The biofilm isolates showed multidrug resistance to antibiotics in comparison with urine isolates. The plasmid profiles of four biofilm isolates and three urine isolates of *P. mirabilis*, and two isolates of *P. vulgaris* one from biofilm isolates and the other from urine isolates were studied, it was found that all of the isolates contain small single plasmid with molecular size equal to molecular size of pBR322. The transformation experiments showed that the *Proteus* plasmids have ability to expression in *Escherichia coli* MM294, and it had a wide host rang. The genes responsible for resistance of ampicillin, tetracycline, chloromphenicol and co-trimixazole were located on these plasmids

المقدمة

تنتشر بكتريا المتقلبات *Proteus* في الطبيعة بشكل واسع ، وهي من مكونات النبيت الطبيعي لأمعاء الانسان الا انها تمثل احد اهم الممرضات الانتهازية له (Jacobsen *et al.*,٢٠٠٨). وما يزيد من أمراضية هذه البكتريا هو ظهور سلالات ذات مقاومة متعددة للمضادات الحيوية نتيجة الاستخدام المتزايد والعشوائي لهذه المضادات ، اذ تمتلك البكتريا آليات مختلفة لمقاومة المضادات الحيوية مثل تغيير حاجز النفاذية وتغيير موقع الهدف او انتاجها لانزيمات البيتالكتميز (Singh *et al.*,2010). تُكون المتقلبات الاغشية الحيوية الرقيقة (Biofilms) وهو احد عوامل ضراوتها ومقاومتها للمضادات الحيوية مقارنة عندما تكون حرة المعيشة (Al-Taai and Naji, 2012).

قد تحتوي الاغشية الحيوية على خليط من الكائنات ملتصقة بالسطوح ومتداخلة مع بعضها ، اذ تنتج مواد بوليميرية خارج خلوية لتقيها من التاثيرات المحيطه بها. تتكون المادة الوراثية لبكتريا *P. mirabilis* من كروموسوم حلقي منفرد يتالف من 4.063 مليون زوج قاعدي وان نسبة الكوانين والسايتوسين فيه ٣٨.٨٨% ، اذ تكون 3,685جين وتحتوي على بلازميد منفرد يتكون من 36,289 نيكليوتيدة (Pearson *et al.*,2008). ان لجينات المتقلبات اثر مهم في التعبير عن العديد من الصفات ومنها المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية (Adeniyi *et*

(*al.*,2006). لذا فقد هدفت الدراسة الحالية الى عزل وتشخيص بكتريا المتقلبات من الاغشية الحيوية للعدد الطبية العلاجية ومن الادرار لمرضى التهاب المجاري البولية ومعرفة مدى علاقة بلازميداتها بالمقاومة المتعددة للمضادات الحيوية.

المواد وطرائق العمل Materials and Methods

1. جمع العينات Collection of samples

جمعت ٣٧٥ عينة سريرية خلال الفتره من تشرين الاول/٢٠١٠ ولغايه شباط /٢٠١١. شملت مسحات من الاغشية الحيوية المتكونة على العدد الطبية العلاجية المستعملة (قثاطر بولية و عدد داخل رحمية) اخذت بواسطة مسحات جاهزة (Disposable swabs) وعينات ادرار لمرضى التهاب المجاري البوليه ، اخذت من اكياس القثاطر البولية (بعد رجها لعدة مرات) ووضعت فى انابيب اختبار معقمه . شملت العينات كلا الجنسين وباعمار تراوحت بين ٥-٨٠ سنه. نقلت العينات الى المختبر لاجراء التجارب اللاحقة عليها.

٢. عزل وتشخيص المتقلبات Isolation and Identification of Proteus

استنبتت المسحات على وسطي أكار الدم (Mast – Blood agar base) و أكار الماكونكي (MacConkey agar–Biolife) وحضنت عند درجة حرارة 37°م لمدة ٢٤ ساعة. أجري التشخيص حسب الطرائق الواردة في Macfaddin (٢٠٠٠). كما تم الحصول على السلالتين القياسيتين *E. coli* MM294 و HB101 *E.coli* من معهد الهندسة الوراثية ، جامعة بغداد.

3. اختبار الحساسية الدوائية Antibiotic susceptibility test

اختبرت حساسية العزلات تجاه ١٨ من المضادات الحيوية والمجهزة بشكل اقراص من شركة Bioanalyse–Turky اعتماداً على ماذكر في CLSI (٢٠١٠).

4. انتاج انزيمات البيتالاكتميز Production of B-lactamase

استخدمت طريقة اليود القياسية السريعة (Rapid Iodine Method) في الكشف عن قدرة العزلات على انتاج انزيمات البيتالاكتميز (Collee *et al.*,1996).

5. استخلاص الدنا الكلي Extraction of whole DNA

اعتمدت طريقة التمليح الخارجي (Salting Out) في استخلاص الدنا الكلي كما ورد في Pospiech and Neuman (١٩٩٥).

٦. التحول البكتيري Bacterialtransformation

استخدم الدنا البلازميدي المستخاص من العزلات في تحويل سلالة البكتريا *E. coli* MM294 كما ذكر في Sambrook and Rusell (٢٠٠١).

٧. الترحيل الكهربائي Gel electrophoresis of DNA

تم اجراء الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز للكشف عن النمط البلازميدي لعزلات بكتريا المتقلبات كما جاء في Sambrook and Rusell (٢٠٠١).

٨. تحييد البلازميدات **Plasmid curing**

استخدمت كبريتات الصوديوم ثنائية الاسيل (Sodium dodecyle sulphate,SDS) في تحييد بلازميدات عزلات المتقلبات المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية (Trevors,1986).

النتائج والمناقشة Results and discussion

تم الحصول على ٤٢ عزلة من المتقلبات ، ٢٦ منها عزلت من ٢٤٠ عينة أخذت من الأغشية الحيوية الرقيقة للعدد الطبية العلاجية (القثاطر البولية والعدد داخل الرحمية) و ١٦ أخرى عزلت من ١٣٥ عينة إدرار أخذت من القثاطر البولية لمرضى مصابين بالتهاب المجاري البولية. شخصت العزلات اعتمادا على خصائصها المظهرية (الزرعية والمجهرية) والاختبارات الكيموحيوية. بلغ عدد عزلات *P. mirabilis* 38 عزلة (٩٠.٤٨%) بينما كان عدد عزلات *P. vulgaris* 4 (9.52%) ولم تظهر الأنواع الأخرى من المتقلبات في العينات المدروسة كما موضح في الجدول ١.

جدول ١ . اعداد وانواع عزلات بكتريا المتقلبات في عينات الدراسة.

نوع العينة	عدد العينات	نمو بكتيري	اعداد وانواع عزلات المتقلبات		عدد العزلات الكلي
			P. mirabilis	*P. vulgaris*	
مسحات الاغشية الحيوية على القثاطر البوليه	١٥٠	٩٠	١٧	٢	١٩
مسحات الاغشية الحيوية على العدد داخل الرحميه	٩٠	٦٠	٦	١	٧
ادرارمن حالات التهاب المجاري البوليه	١٣٥	٩٠	١٥	١	١٦
المجموع	٣٧٥	٢٤٠	٣٨	٤	٤٢

اقتربت هذه النتائج من نتائج Baqai وجماعته (٢٠٠٨) اذ وجدو ان نسبة عزل بكتريا المتقلبات من الاغشية الحيوية المتكونة على القثاطر البولية المستخدمة في علاج مرضى التهاب المجاري البولية ٢٠% وكذلكMorgan and Stickler (٢٠٠٦) اذ اكدا على ان بكتريا المتقلبات هي السائدة في تكوين الاغشية الحيوية الرقيقة على القثاطر البولية لمرضى التهاب المجاري البولية والراقدين لفترات زمنية طويلة. بينما اختلفت هذه نتائج عن ما وجده Stickler ((٢٠٠٨) من ان ٣٣ % من بكتريا الاغشية الحيوية المتكونة على القثاطر البولية كانت عائدة للمتقلبات. تبين هذه الدراسه ان ٩٠ عينة من اصل ١٣٥ عينة للادرار كانت موجبة للزرع البكتيري أي بنسبة ٦٦.٦%، شخصت منها ١٦ عزلة بكتيرية عائدة للمتقلبات أي بنسبة ١٧.٧ %. كانت نسب الاصابة في الاناث واطئة مقارنة بالذكور وربما يعزى سبب ذلك الى حساسية بكتريا المتقلبات للسائل المهبلي نتيجة انخفاض رقمه الهيدروجيني مقارنة بالانواع الاخرى من البكتريا وهذا ما اشار اليه Glennon وجماعتة (١٩٨٨). كما ان نسب اصابة الفئتان العمريتان ٢٠-٥ و ٨٠-٦٥ سنة ببكتريا المتقلبات كانت عاليه كما مبين فى الجدول ٢ ، وقد

يعود السبب في ذلك لكون الاعمار المتطرفة (الاطفال وكبار السن) اكثر تعرض للاصابة بسبب ضعف الجهاز المناعي مقارنة بالفئات العمرية الاخرى.

جدول ٢. تأثير عاملي الجنس والعمر على الاصابة ببكتريا المتقلبات.

العامل	متقلبات الاغشية الحيوية	النسب المئوية (%)	متقلبات الادرار	النسب المئوية (%)	مجموع المتقلبات	النسب المئوية (%)
A. **الجنس**						
ذكور	١٢	28.57	١١	26.19	٢٣	54.76
اناث	١٤	٣٣.٣٣	٥	11.90	١٩	45.23
B. **العمـــر**						
(سنة)	٣	7.14	٤	9.52	7	16.66
٢٠-٥	٢	4.76	٢	4.76	4	9.52
٣٥-٢٠	٤	9.52	٢	4.76	6	14.28
٥٠-٣٥	١٠	23.80	٣	7.14	13	30.95
٦٥-٥٠	٧	16.66	٥	١١.٩٠	12	28.27
٨٠-٦٥						

اظهرت العزلات اعلى نسب مقاومة لكل من المضادات Ampicillin ، Amoxicillin ، Rifampin ، Tetracyclin، Erythromycin ، Vancomycin و Co-trimixazol اذ بلغت نسبة المقاومة (١٠٠%) بينما كانت اقل نسبة مقاومة لمضاد السبروفلوكساين (٧.٦%) كما مبين في الجدول ٣. تقاوم البكتريا المضادات بعدة آليات اعتمادا على نوع المضاد الحيوي والبكتريا وتشمل هذه الاليات وجود انزيمات تحور او تحلل المضاد الحيوي، وجود انزيمات بديلة للانزيمات التي تثبطها المضادات الحيوية ، تحوير موضع الهدف للمضاد الحيوي ، تقلل نفاذ المضاد الى الخلية وامتلاك آلية الدفق الفعال والتي تعمل على اخراج المضاد خارج الخلية ومنع تراكمه داخل الخلية (Ueda and Sunagawa, 2003 ؛ Lamber *et al.,2001*). كانت٢١ عزلة من مجموع ٤٢ عزلة لبكتريا المتقلبات منتجة لانزيمات البيتالاكتميز أي بنسبة ٥٠% (١٣عزلة من عزلات الاغشية الحيوية و٨ من عزلات الادرار). وقد يعزى سبب مقاومة العزلات غير المنتجة لانزيمات البيتالاكتميز الى امتلاكها آليات اخرى للمقاومة مثل تغيير حاجز النفاذية او تغيير في موقع الهدف او امتلاكها انظمة الدفق كما اشار اليها Chuanchune وجماعته (٢٠٠١).

جدول 3 . النسب المئوية لمقاومة المتقلبات للمضادات الحيوية.

المضاد الحيوي	التركيز (µg/disk)	النسب المئوية للمقاومة(%)	
		عزلات الاغشية الحيوية	عزلات الادرار
Chloramphenicol	٣٠	١٠٠	١٠٠
Ceftazidime	٣٠	٨٧	٨٠
Cefotaxime	٣٠	١٠٠	٦٨.٧
Ciprofloxacin	٥	٧.٦	٠
Ampicillin	١٠	١٠٠	١٠٠
Streptomycin	٣٠	٨٠	٧٥
Tetracyclin	٣٠	١٠٠	١٠٠
Trimethoprim	٥	٨٠	٧٥
Amikacin	٣٠	١٩.٢	٠
Imipenem	١٠	٣٠	١٢.٥
Meropenem	١٠	٢٣	٠
Erythromycin	١٥	١٠٠	١٠٠
Vancomycin	٣٠	١٠٠	١٠٠
Amoxicillin	٢٥	١٠٠	١٠٠
Gentamycin	١٠	٥٣.٨	٢٥
Rifampin	٥	١٠٠	١٠٠
Co-trimixazol	٣٠	١٠٠	١٠٠
Pipracillin	٣٠	٦٥	٦٢.٥

كانت٢١ عزلة من مجموع ٤٢ عزلة لبكتريا المتقلبات منتجة لانزيمات البيتالاكتميز أي بنسبة ٥٠% (١٣عزلة من عزلات الاغشية الحيوية و٨ من عزلات الادرار). وقد يعزى سبب مقاومة العزلات غير المنتجة لانزيمات البيتالاكتميز الى امتلاكها آليات اخرى للمقاومة مثل تغيير حاجز النفاذية او تغيير في موقع الهدف او امتلاكها انظمة الدفق كما اشار اليها Chuanchune وجماعته (٢٠٠١).

يوضح الشكل ١ نتائج الترحيل الكهربائي لاربعة عزلات من *P. mirabilis* المعزولة من الاغشية الحيوية اذ تميزت هذة العزلات بمقاومتها للمضادات الحيوية. احتوت جميع العزلات على بلازميد واحد صغير(ذو حجم اقل من حجم البلازميد pBR322). ظهر هذا البلازميد بشكلين هما الدائري المغلق تساهميا (CCC) و الخيطي (L) ، أن تعرض البلازميدات لضغوط وعوامل مختلفة يؤدي الى ظهور البلازميدات باشكال مختلفة اثناء الترحيل الكهربائي

(Meyers *et al.*,1976). اشار Girlich وجماعته (٢٠٠٠) الى احتواء بكتريا المتقلبات على بلازميدات صغيرة ذات حجم جزيئي ١١٢ كيلو زوج قاعدي يحمل الجينات المشفرة لاغلب عوامل الضراوة ومقاومة المضادات الحيوية. احتوت عزلات الادرار لبكتريا *P. mirabilis* على بلازميد واحد مشابه فى صفاته لبلازميد عزلات الاغشية الحيوية (الشكل ٢). بين Sabbuba وجماعته (٢٠٠٤) تشابه المحتوى الوراثي لعزلات المتقلبات المعزولة من الاغشية الحيوية للقثاطر البولية و الادرار. كما يوضح الشكل ٣ .الترحيل الكهربائي لعزلات *P. vulgaris* المعزولة من الاغشية الحيوية و الادرار، اذ احتوات جميع عزلات *P. vulgaris*على بلازميد واحد ذات حجم مقارب لحجم البلازميد pBR322 . اشار Ramesh وجماعته (٢٠١٠) امتلاك بكتريا *P. vulgaris* على بلازميد مفرد ذو حجم جزيئي ١٥-٨ كيلو زوج قاعدي يحمل الجينات المسئولة عن المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية وعوامل الضراوة. توجد جينات المقاومة المتعددة لبكتريا المتقلبات على بلازميدات صغيرة قابلة للانتقال وان هذة البلازميدات تكون ذات فعالية عاليه في تحويل الاجناس البكتيرية الاخرى في الطبيعة (Mandal *et al.*,2004). لاتحتوي جميع عزلات المتقلبات على بلازميدات اذ ان للكروموسوم البكتيري دور واضح في المقاومة للمضادات الحيوية. وهذا ما اكده Diab وجماعته (٢٠٠٢) اذ وجدو ان بعض جينات المقاومة وخاصة المسئولة عن انتاج البيتالاكتميز محمولة على الكروموسوم.

استخدمت كبريتات الصوديوم ثنائية الاسيل (SDS) في تحييد بلازميدات عزلتان لكل من *P. mirabilis* و *P. vulgaris* واحده منها عائدة لعزلات الاغشية الحيوية والاخرى لعزلات الادرار. بعد معاملة العزلات بتراكيز ٣٥,٣٠,٢٥,٢٠,١٥,١٠,٥ و ٤٠ مايكروغرام/مل من SDS تم تحديد التركيز القاتل والذي توقف عنده نمو البكتريا وهو ٣٥مايكروغرام/مل وكان التركيز المثبط الادنى ٣٠ مايكروغرام/مل. تم تحديد التركيز الامثل للنمو بوجود SDS والذي ادى الى تحييد بلازميدات بكتريا المتقلبات ، اذ بلغ ٢٥ مايكروغرام/مل. وبعد اختبار حساسية العزلات المعاملة بمادة SDS لمضادات الامبسلين والاموكسلين والسبروفلوكساسين والكلورومفنكول والاميكاسين والتتراسايكلين والسيفوتاكسيم فقدت عزلات *P. mirabilis* المعزولة من الاغشية الحيوية مقاومتها للمضادات الحيوية. اما عزلات *P. vulgaris* فقد احتفظت بمقاومتها لمضاد الاموكسلين وقد يعود السبب في ذلك الى امتلاكها جينات المقاومة على الكروموسوم. تم اجراء فحص انتاج انزيمات البيتالاكتميز للعزلات المحيدة ولوحظ فقدان جميع عزلات *P. mirabilis* قابليتها على انتاج هذه الانزيمات وهذا يبين ان الجينات المشفرة لهذه الانزيمات محمولة على البلازميدات. اشار Luzzaro وجماعته (٢٠٠١) الى ان الجينات المسئولة عن انتاج هذه الانزيمات محمولة على بلازميدات في بكتريا المتقلبات. احتفظت عزلات *P. vulgaris* بقدرتها على انتاج هذه الانزيمات وقد يعود السبب الى احتواء كروموسوم هذه العزلات على جينات مشفرة لهذه الانزيمات اذ ان بعد استخلاص دنا العزلات المحيده والكشف عن حزم الدنا لوحظ اختفاء حزم الدنا البلازميدي (شكل ٤) .

ان فقدان الحزم البلازميدية المتوافق مع فقدان المقاومة للمضادات الحيوية يعطي دليلاً واضحاً على ان جينات المقاومة محمولة على البلازميدات. اشار El-Baghdady وجماعته (٢٠٠٩) الى ان استخدام مادة SDS في تحييد بكتريا المتقلبات يؤدي الى فقدان مقاومتها لمعظم المضادات الحيوية وبعض عوامل ضراوتها. وفي دراسة Mansouri وجماعته (٢٠٠٥) اكدت ان جينات المقاومة للمضادات الحيوية في بكتريا المتقلبات محمولة على بلازميدات صغيرة وان فقدان هذه البلازميدات يؤدي الى فقدان مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية. بين Khder

(٢٠٠٨) ان جينات مقاومة الامبسلين ، الاموكسلين ، السبروفلوكساسين ، الجنتامايسين ، الكلورومفنكول والارثرومايسين محمولة على بلازميدات في بكتريا المتقلبات.

تم اجراء عملية التحول الوراثي وذلك باستخلاص الدنا البلازميدي من ١٠ عزلات للاغشية الحيوية و ١٠عزلات للادرار للنوع *P.mirabilis* المراد اختبار قدرتها على تحويل السلالة القياسية *E. coli* MM294 الحاملة لصفة مقاومة الريفامبين. استخدم مستخلص الدنا البلازميدي pBR322 الحامل لصفة مقاومة التتراسايكلين والامبسلين بوصفها سيطرة موجبة لعملية التحول. ان الغرض من اجراء التحول الوراثي هو التحري عن البلازميدات الحاملة لجينات المضادات الحيوية. استخدمت طريقة الخزن بالتجميد للخلايا المؤهلة للتحول وذلك لزيادة كفاءة التحول. اشار Cohen وجماعته (١٩٧٢) الى ان معاملة الخلايا بمادة كلوريد الكالسيوم المبرد ثم تعريضها لصدمة حرارية لعدة ثوانٍ يسهل عملية دخول الدنا البلازميدي للخلايا. بينت نتائج الدراسة الحاليه نجاح ٨ عمليات تحول وراثي من مجموع ٢٠ محاولة أي بنسبة ٤٠% بالاضافة الى السيطرة الموجبة المتمثلة التحول بالبلازميد pBR322 من السلالة *E. coli* HB101 واستخدمت الاوساط الزرعية الحاوية على الامبسلين والريفامبين للكشف عن الخلايا المتحولة. كان اعلى تردد تحول وراثي هو ٢.٥ ×١٠$^{-٢}$ للبلازميد pBR322 وقد يعود ذلك لصغر حجمه اذ لايتجاوز ٥ كيلوزوج قاعدي، بينما تراوحت قيم تردد التحول ببلازميد المتقلبات من ٤.٥×١٠$^{-٣}$ للعزلة ٣ المتحولة الى ٥.٨ ×١٠$^{-٥}$ للعزلة ٢٦ المتحولة. ويوضح جدول ٤ نتائج التحول الوراثي، اما العزلات التي لم تنجح معها عملية التحول فقد يعود السبب في ذلك الى ان البلازميدات قد تكون كبيرة بحيث لاتنفع معها عملية التحول الوراثي.

جدول ٤. التحول الوراثي بالدنا المستخلص من عزلات *P. mirabilis*

رقم العزلات المتحولة:- في الاغشية الحيوية	عدد الخلايا المتحولة	عدد الخلايا المؤهلة	تردد التحول
3	٣.٢ ×١٠^{٢}	٧×١٠^{٤}	٤.٥×١٠$^{-٣}$
٨	٣.٤×١٠^{٢}	٩×١٠^{٤}	٣.٧×١٠$^{-٣}$
١٩	٢.٣×١٠^{٢}	٥×١٠^{٥}	٤.٦×١٠$^{-٤}$
٢٢	١.١×١٠^{٢}	٨×١٠^{٥}	١.٣×١٠$^{-٤}$
٢٦	٦.٣×١٠^{٢}	٩×١٠^{٥}	٧×١٠$^{-٤}$
	B. في الادرار		
٤	١٨×١٠^{٢}	٥×١٠^{٥}	٣.٦×١٠$^{-٣}$
١٠	٨.٥×١٠^{٢}	٣×١٠^{٦}	٢.٨×١٠$^{-٤}$
١٦	٣.٨×١٠^{٢}	٦.٥×١٠^{٦}	٥.٨×١٠$^{-٥}$
السلالة *E. coli* HB101 المتحولة ببلازميد pBR322	١٥×١٠^{٤}	٦×١٠^{٦}	٢.٥×١٠$^{-٢}$

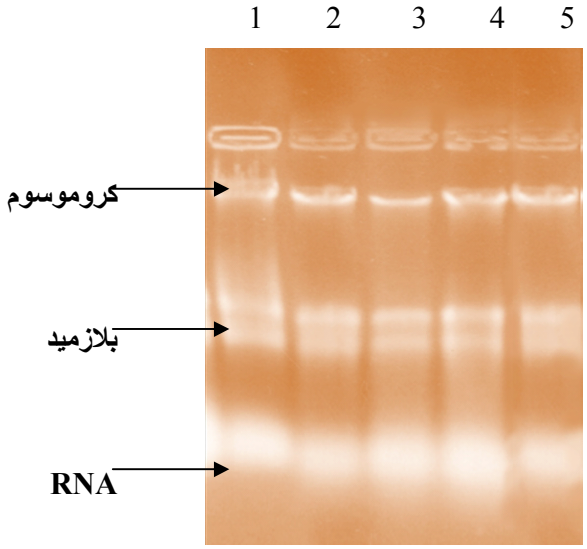
اختبرت حساسية العزلات المتحولة تجاه المضادات الحيوية (الامبسلين ، التتراسايكلين ، الكوترامكسازول، الاميكاسين ، الجنتامايسين ، السيفوتاكسيم ، السبروفلوكساسين والكلورامفنكول) بطريقة الاقراص الورقية لمعرفة ما تم نقلة من جينات مقاومة للمضادات الحيوية عن طريق البلازميدات ويوضح الجدول ٥ نسب انتقال جينات المقاومة

للمضادات الحيوية بواسطة التحول الوراثي. كانت اعلى نسبة انتقال لجينات المقاومة للامبسلين (١٠٠%) يليه التتراسايكلين (٨٧.٥ %) بينما كانت اقل نسبة انتقال للسيفوتاكسيم (٣٧.٥ %). تتفق هذه الدراسة مع ما اشار اليه Diab وجماعته (٢٠٠٢) الى ان نسبة انتقال جينات مقاومة الامبسلين بواسطة بلازميد المتقلبات كانت ١٠٠%. تشير نتائج هذه الدراسة الى ان نسبة انتقال جينات المقاومة لكل من الكوترايمكسازول ، الاميكاسين والكلورومفنكول هي٧٥ % وتتفق هذه النتائج مع ما اشار اليه Khder (٢٠٠٨) من ان النسبة العالية لانتقال جينات مقاومة الكلورومفنكول ومضادات اخرى لبكتريا*E. coli* القياسية المتحولة ببلازميد *P. mirabilis* اما مضاد السيفوتاكسيم فكانت نسبة المقاومة له ٣٧.٥% .

جدول ٥. النسب المئوية لانتقال جينات المقاومة للعزلات المتحولة للمضادات الحيوية.

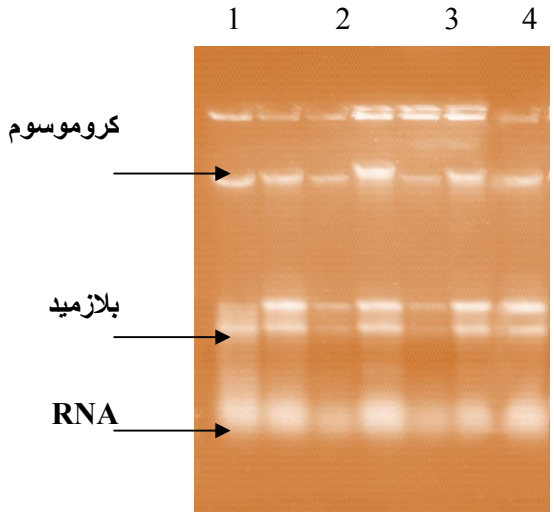
المضاد الحيوي	عدد العزلات المتحولة والمقاومة	النسب المئوية لانتقال جينات المقاومة (%)
امبسلين	٨	١٠٠
تتراسايكلين	٧	٨٧.٥
كوترايمكسازول	٦	٧٥
امكاسين	٦	٧٥
جنتامايسين	٤	٥٠
سيفوتاكسيبم	٣	٣٧.٥
سبروفلوكساسين	٥	٦٢.٥
كلورومفنكول	٦	٧٥

اما مضادات الامينوكلايكوسيدات فكانت نسبة انتقال جينات مقاومتها هي٧٥ % و٥٠% للاميكاسين والجنتامايسين على التوالي. بينما كانت نسبة انتقال السبروفلوكساسين هى 62.5%. ففى دراسة اجراها Perilli وجماعته (٢٠٠٢) وجدو ان مقاومة معظم مضادات البيتالاكتم للبكتريا المعوية كان من خلال انتاج انزيمات البيتالاكتميز من النوع TEM2,TEM1وSHV1 المشفرة بواسطة الجينات *blaTEM* و *blaSHV* المحمولة بلازميديا. بينما بين El–Baghdady وجماعته (٢٠٠٩) ان مقاومة معظم المضادات الحيوية وبعض عوامل الضراوة الاخرى لبكتريا المتقلبات تتوسطها بلازميدات لها القابلية على الانتقال عن طريق التحول الوراثي والاقتران البكتيري. بعد استخلاص دنا المتحولات وترحيله كهربائيا بهلام الاكاروز كان النسق البلازميدي للمتحولات مشابهاً للنسق البلازميدي للمتقلبات (شكل ٥) ، وهذا يدل على نجاح التحول وانتقال الجينات الحاملة لصفة مقاومة المضادات الحيوية. ان نجاح البلازميدات الصغيرة الحجم المستخلصة من عزلات المتقلبات على التعبير في سلالة *E. coli* MM294 يدل على انها ذات مدى مضيفي واسع. تشير الدراسات الى امكانية تعبير بلازميدات المتقلبات في بكتريا *E. coli* . فقد اشار Mandal وجماعته (٢٠٠٤) الى ان جينات المقاومة المتعددة لبكتريا المتقلبات تكون محمولة على بلازميدات صغيرة الحجم وان هذه البلازميدات ذات كفاءة عالية في الانتقال وتحويل الانواع الاخرى من البكتريا ومنها *S.typhi* و *E.coli* ويعد ذلك من الاسباب الرئسية لانتشار المقاومة المكتسبة للمضادات الحيوية.



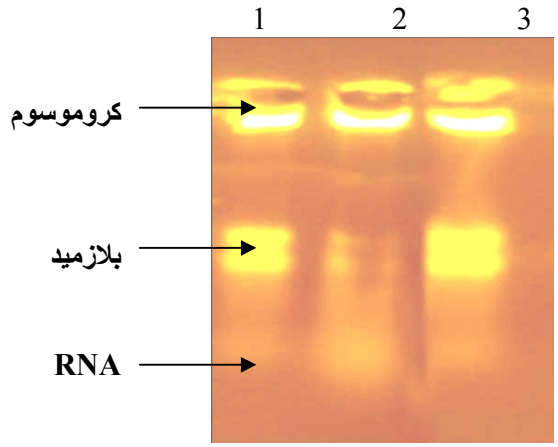
شكل١. الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز (٠.٨%) بفرق جهد ٦٥ فولت لمدة ٣ ساعات يظهر الحزم الكروموسومية والبلازميدية لعزلات *P. mirabilis* المعزولة من الاغشية الحيوية.

المسار ١: البلازميد pBR322.
المسار ٢ : العزلة ٣ *P. mirabilis*
المسار ٣ : العزلة ٥ *P. mirabilis*
المسار : ٤ العزلة ٩ *P. mirabilis*
المسار : ٥ العزلة ٢٦ *P. mirabilis*



شكل ٢. الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز (٠.٨%) بفرق جهد ٦٥ فولت لمدة ٣ ساعات يظهر الحزم الكروموسومية والبلازميدية لعزلات *P. mirabilis* المعزولة من الادرار.

المسار ١: البلازميد pBR322.
المسار ٢: العزلة ٤ *P. mirabilis*
المسار ٣ : العزلة ١٥ *P. mirabilis*
المسار ٤ :العزلة ١٦ *P. mirabilis*

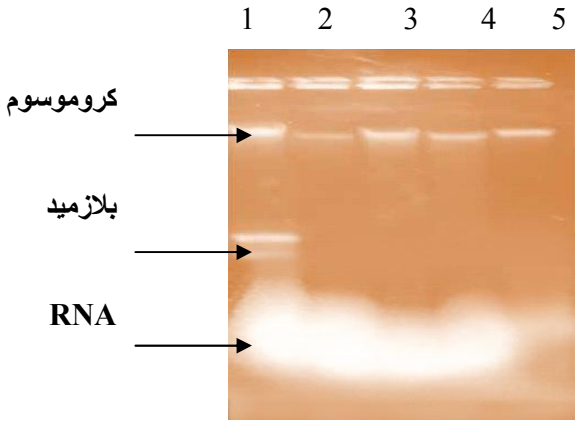


شكل ٣. الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز (٠.٨%) بفرق جهد ٦٥ فولت لمدة ٣ ساعات يظهر الحزم الكروموسومية والبلازميدية لعزلات *P. vulgaris* المعزولة من الأغشية الحيوية والادرار.

المسار ١: البلازميد pBR322.

المسار ٢: العزلة ١١ *P. vulgaris* المعزولة من الاغشية الحيوية.

المسار ٣: العزلة ٩ *P. vulgaris* المعزولة من الادرار.



شكل ٤ . الترحيل الكهربائي في الاكاروز (٠.٨%) بفرق جهد ٦٥ فولت لمدة ٣ ساعات يظهر موقع حزم الدنا البلازميدي والكروموسومي لعزلات المتقلبات المعاملة وغير المعاملة بمادة SDS.

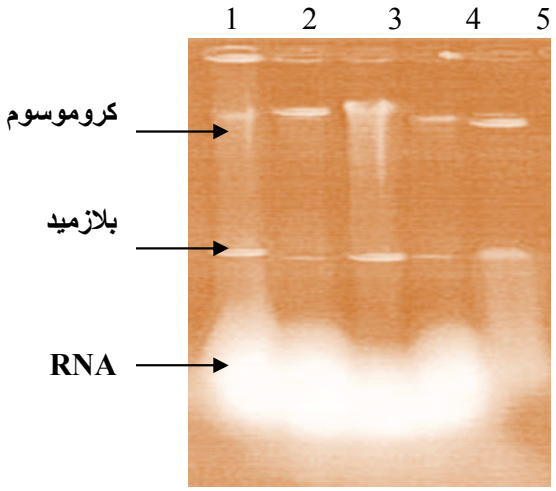
المسار ١: البلازميد pBR322.

المسار ٢: العزلة ٣ *P. mirabilis* من الاغشية الحيوية.

المسار ٣: العزلة ١٦ *P. mirabilis* من الادرار.

المسار ٤: العزلة ١١ *P. vulgaris* من الاغشية الحيوية.

المسار ٥: العزلة ٩ *P. vulgaris* من الادرار المعاملة بمادة SDS.



شكل ٥ . الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز (٠.٨%) بفرق جهد ٦٥ فولت لمدة ٣ ساعات والذي يظهر الحزم الكروموسومية والبلازميدية للعزلات المستخدمة في التحول.

المسار ١: السلالة *E. coli* HB101 الحاوية على البلازميد pBR322.

المسار ٢: السلاله *E. coli* MM294 المتحولة بالبلازميد pBR322.

المسار ٣: السلالة *E. coli* MM294 المتحولة ببلازميد العزلة ٣ من الاغشية الحيوية.

المسار ٤: السلالة *E. coli* MM294 المتحولة ببلازميد العزلة ٢٦ من الاغشية الحيوية.

المسار ٥: السلالة *E. coli* MM294 المتحولة ببلازميد العزلة ١٦ من الادرار.

References

Adeniyi, B. A., Amajoyi, C. C. and Smith, S. I. (2006). Plasmid profiles of uropathogenic *Escherichia coli, Klebsiella* Spp, *Proteus* Spp. and *Pseudomonas* Spp. isolates. J. Biol. Sci. 6 (3):527-531.

Al-Taai, K. A. and Naji, H. F. (2012). Effect of β -lactam and aminoglycosides combination on multidrug resistance *Proteus*. J. Bab. Uni. *20*(6): In press.

Baqai, R., Aziz, M. and Rasool G.(2008). Urinary tract infection in diabetic patients and biofilm formation of uropathogens. J. Infect. Dis. Pakistan .*1*(17): 7-9.

Chuanchune, R., Beinlich, K., Hoang, T. T., Becher, A. and Schweizer, R. K.(2001). Multidrug efflux pumps mediate cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects nfx mutants over expressing Mex CD-Opr. J. Antimicrob. Agents. Chemother. *45* (2): 428-32.

Clinical and laboratory standars institute(CLSI). (2010). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 20.ed. approved standars, M 100-S20 and M100-S19, U.S.A.

Cohen, S.N., Chang, A.C. and Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria. genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc. Nat Acad. Sci. USA. *69*(8): 2110-2114.

Collee, J. G. , Fraser, A. G. , Marmion, B. P. and Simmons, A. (1996). Mackie and mecartney. Practical microbiology. 14th.ed. Churchill Livingstone. USA. P:413-424.

Diab, A.M, Abdel Aziz,A.M. and Selim, S.A.(2002). Plasmid encoded transferable antibiotic resistance in Gram-negative bacteria isolates from driking water in Ismailia city. Pakistan. J. Biol. Sci. *5*(7):774-779.

El-Baghdady, K.Z., Abooulwafa, M.M., Ghobashy, M. O. and Gebreel,H. M. (2009). Plasmid mediated virulence factors of some *Proteus* isolates. Egypt. Acad. J. Biol. Sci. *1*(1): 7-22.

Girlich, D., Naas, T., Bellais, S., Poirel, L., Karim, A. and Nordmann, P. (2000). Biochemical- genetic characterization and regulation of expression of ACC-1-like chromosome-borne cephalosporinase from *Hafnia alvei*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. *44* :1470-1478.

Glennon, J., Ryon, P. J., Keane,V. T. and Rees, J. P. (1988). Circumcision and periurethral carriage of *Proteus mirabilis* in boys. Arch.of Disease in Childhood. *63*: 556-558.

Jacobsen, S. M., Stickler, D. J. Mobley,H. L. T and . Shirtliff, M. E. (2008). Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. Clin. Microbiol. Rev. *1* (21):26–59 .

Khder, A. K. (2008). Effect of *Allium sativum* and *Myrtus communis* on the elimination of antibiotic resistance and swarming of *Proteus mirabilis.* JJBS . *3* (1):124 – 128.

Lamber ,O. , Michea-Hamzehpour,M. , Kohler,T. , Chau,F. , Fanrisson,F. and *et al*. (2001). Differential selection of multidrug efflux mutants by trovafloxacin and ciprofloxacin in an experimental model of *Pseudomonas aeruginosa* and acute pneumonia in rats. J. Antimicrobial. Agents. Chemother. 44:571-576.

Luzzaro, F. , Lombardi, G. , Perilli, M. , Belloni, R. , Amicosante, G. and Toniolo, A. (2001). Antimicrobial susceptibility testing and esbl production in clinical isolates of Proteus mirabilis: an evaluation with the phoenix™ automated microbiology system. Am. J. Soci. Microbiol. Orland. Florida. *101*:686-689.

Macfaddin, J. F. (2000). Biochemical test for identification of medical bacteria. 3rd.ed. Lippincott Williams and Wilkins. New York.. PP: 214-289.

Mandal, S., Mandal, M. D. and Pal, N. K. (2004). Plasmid-encoded multidrug resistance of *Salmonella typhi* and some enteric bacteria in and around Kolkata, India. *4* (3): 1-7.

Mansouri, S., Amari, A. and Asadi, A. G. (2005). Inhibition effect of some medical plants from Iran onswarming motility of *Proteus* rods. J. Med. Sci. *5* (3):216-221

Meyers, J. A., Sanchez, D., Elwell, L. P. and Falkow, S. (1976). Simple agarse gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol. *127*: 1529 -1537.

Pearson, M. M., Sebaihia M., Churcher,C. , Quail, M., Seshasayee, A. A. and *et al*., (2008). Complete genome sequence of uropathogenic *Proteus mirabilis,* a master of both adherence and motility. Amer. Soci. Microbiol. 11 (190):4027–4037.

Perilli, M., Dell Amico, E., Segatore, B., Maria, R, Bianchi, C., Luzzaro, F., Rossolini, G., Tonniolo, N. and Amicosante, G. (2002). Molecular characterization of extended spectrum β - Lactamases produced by nosocomial isolates of enterobacteriaceae from an Italian Nation Wide Survey. J. Clin. *40*(2): 611-614.

Pospiech, A. and Neuman, A. (1995). Preparation and analysis of genomic and plasmid DNA. In: Genomic DNA isolation, T. Kieser eds. Johninnes Center, Norwich NR47 UH, U.K.

Ramesh, S., Monivasagan, P, Ashokkumar, S., Ragaram, G. and Mayayvau, P. (2010). Plasmid profiling and multiple antibiotic resistance of heterotrophic bacteria isolatesd from Muthupettai Mangrove environment, southeast coast of India. Curr. Res. Bacteriol. *3* (4):227-237.

Sabbuba, N., Hughes, G. and Stickler, D. J .(2004). Genotyping demonstrates that the strains of *Proteus mirabilis* from bladder stones and catheter encrustations of patients undergoing longterm bladder catheterization are identical. J. Urol. 171: 1925–1928.

Sambrook, J. and Russel, R. W. (2001). Molecular clonning. A laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring, Harber Laboratories Press. Cold Spring Harber . NewYork.

Singh, V., Sharma,L., Kanta, R., Sharma, S., Chauhan, S. and Chauhan, P. K. (2010). Antimicrobial activity of *Proteus* bacteria isolated from raw milk of Paonta Valley. Int. J. Phar. Bio Sci. *1*(2):1-4.

Stickler, D. J.(2008). Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters. Rev. Nature. Clin. Urol. 11(5): 598-608.

Stickler, D.J. and Morgan, S.D.(2006). Modulation of crystalline *Proteus mirabilis* biofilms development on urinary catheters. J. Med. Microbiol. 55, 489-494.

Treviors, J. T. (1986). Plasmid curing in bacteria. FEMS. Micobiol. Rev. *32*: 149-157.

Ueda, Y. and Sunagawa, M. (2003). *In vitro* and *in vivo* activity of novel 2- thiazol-2-xlthio-1-beta-methylcarbapenemes with potent activity against multiresistant Gram-positive bacteria. Antimicrob. Agents. Chemother. Aug. *47*(8):2471-2478.