------ مجلة علوم الرافدين، المجلد16، العدد6، خاص بعلوم الحياة، ص85-92، 2005 ------

دراسة بعض صفات الـ DNA البلازميدي في جرثومة *Klebsiella pneumoniae* المعزولة من حالات مرضية مختلفة في الانسان

اياد حازم حسن
فرع الادوية
كلية الصيدلة
جامعة الموصل

خالد دحام احمد
قسم علوم الحياة
كليةالتربية
جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2002/3/30 ، تاريخ القبول 2002/6/18)

الملخص

درست نماذج جرثومة *Klebsiella pneumoniae* المعزولة من حالات مرضية مختلفة في الانسان (البول، القيح، البراز، القشع، السائل المخى الشوكي). صنفت النماذج الى خمسة مجاميع من العزلات استناداً الى مقاومتها للمضادات الحيوية (الامبسلين، التيتراسايكلين، الكلورامفينيكول، الستربتومايسين، السيفالكسين). درست بعض صفات الـ DNA البلازميدي المنقى من هذه العزلات، كقابلية الانتقال الذاتي لجزيئات الـ DNA البلازميدي من خلال عملية الاقتران. اذ اظهر الـ DNA البلازميدي للعزلات (1، 2، 4) هذه القابلية وتحويل صفة مقاومة المضادات الحيوية الى سلالة JM83 المختبرية. ثم درس التضخيم للـ DNA البلازميدي في هذه العزلات. اظهرت العزلتان (3، 5) فقط القابلية على تضخيم عدد نسخ بلازميداتها بوجود الكلورامفينيكول (100 مايكروغرام/مل).

Study of Some DNA Plasmid Characters Purified From *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Various Human Infection

Ayad H. Hasan
Department of Pharmacology
College of Pharmacy
Mosul University

Khalid D. Ahmed
Department of Biology
College of Education
Mosul University

ABSTRACT

Specimens of the isolated bacteria *Klebsiella pneumoniae* from various pathogenic cases in human (urine, pus, stool, sputum, cerebrospinal fluid) were studied. These specimence were classified into five groups of isolates according to their resistance to the antibiotics (ampicillin, tetracycline, chloramphenico, streptomycine, cephalexine). Some of the characters are studied for the plasmid DNA in these isolates, of these, the self-

transmissible ability of the plasmid DNA molecules though conjugation.The plasmid DNA of the isolates (1, 2, 4) have the ability to transfer the antibiotic resistant genes to the laboratory strain of *E. coli* (JM83). Then the amplification of the plasmid DNA were studied in these isolates. Only the isolates (3, 5) have revealed high yield of purified plasmid DNA in the presence of chloramphenicol (100µg/ml).

المقدمة

تعد جرثومة *Klebsiella pneumoniae* اكثر انـواع جـنس *Klebsiella* نـشاطا مـن الناحيـة الكيموحيوية ويمثل ما يقرب 95% مـن العـزلات السـريرية التابعة لهذا الجنس (Koneman et al., 1997) وهو يعد من الممرضات الانتهازية المهمة الذي عادة ما يصيب كلاً من الجهاز البولي التناسـلي والجهاز التنفسي حيث وجد بان نسبة الوفيـات فـي اصابـات الجهاز التنفسي (ذات الرئة) اكثـر من 50%، احياناً يغزو هذا النوع مجرى الدم مسبباً الانتان الدموي، يعـد ايـضاً مـن المـسببات المهمة لعدوى المستشفيات (Hansen et al., 1999; Alvarez et al., 2000) البلازميدات عبـارة عـن جزيئات DNA حلقية توجد بشكل مستقل عن كرموسوم الخلية المضيفة وتوجد في سـايتوبلازم معظـم انواع الجراثيم وعدد من كائنات حقيقية النواة كالخمائر والفطريات، تتوارث بثبات ولهـا القابليـة علـى التكرار الذاتي لامتلاكهـا منـشأ تـضاعف مـستقل (Dery et al., 1997; Ingmer et al., 1998). ان البلازميدات الموجودة في *K. pneumoniae* تكون من نوع Megaplasmid الذي يكون حجمـه مـابين 50-100 كيلوقاعدة (Albiger et al., 1999) .

تمتلك البلازميدات الكبيرة غالباً قابلية الانتقال الذاتي Self-transmissible، المثال التقليـدي لهـذا النوع من البلازميدات هو البلازميد F الذي يحمل متطلبات الاقتران جميعها وهـي مورثـات الانتقـال Transfer genes (tra genes) والتي تشمل المورثات التركيبية لتكوين الـشعيرات الجنـسية Sex pili، منشأ الانتقال Transfer origin (oriT) وهو الموقع الذي يبدأ عنده النقل، وبـروتينـات قـاطعة تسمى Mobilization proteins (mob proteins) تشفر من قبل mob gene تعمل على قطـع احـد شـريطي البلازميد عند الموقع oriT ويرتبط تساهمياً بالنهاية 5' للشريط المقطوع للبدء بعملية الانتقال على شـكل جزيئـة DNA خطيـة مفـردة الـشريط الـى داخـل الخليـة المـستلمة خـلال جـسر الاقتـران (Dery et al., 1997; Kingsman and Willetts, 1978). غالبا مايكون البلازميد R في العائلة المعويـة ذاتي الانتقال، وقد وجد ان جرثومة *K. pneumoniae* تمتلك هذا النوع من بلازميد R ذاتي الانتقال بحيث يمكـن انتقالـه الـى خليـة مـستلمة مختبريـة مـن جرثومـة *E. coli* او*K. pneumoniae* (Markowitz et al., 1980). ان عملية التضخيم الجيني تنتج عن طريق تثبيط تـضاعف كروموسـوم الخلية الجرثومية واستمرار تضاعف البلازميدات بوساطة تنمية الخلية الجرثومية بوجود المضاد الحيوي الكلورامفينيكول او السبكتينومايسين او بوساطة تجويع الاحماض الامينية (Clewell, 1972).

المواد وطرائق العمل

السلالات البكتيرية والاوساط المستخدمة:

استخدمت في هذه الدراسة سلالة *E. coli* مختبرية وهي JM83 (George M Weinstock، قسم الكيمياء الحياتية والبايولوجي الجزيئي، جامعة تكساس، الولايات المتحدة الامريكية) و30 عزلة من *K. pneumoniae* المعزولة من حالات مرضية مختلفة (البول، القيح، البراز، القشع والسائل المخي الشوكي) في الانسان من مستشفى السلام العام في الموصل.وقد شخصت العزلات بوساطة تقنية API 20E (Atlas *et al.*,1995)، استخدم وسط المرق المغذي ووسط الاكار المغذي فضلا عن وسط اكار الماكونكي.

مقاومة المضادات الحيوية:

تم اختبار مقاومة العزلات الجرثومية للمضادات الحيوية المستخدمة في هذه الدراسة بالتراكيز النهائية الاتية: (مايكروغرام/مل) الامبسلين (Ap)50،الكلورامفينيكول(Cm)10،التيتراسايكلين (Tc)15 ،الستربتومايسين (Sm)25،السيفالكسين (Cf)30.

الاقتران الجرثومي:

لتحديد صفة الانتقال الذاتي للـ DNA البلازميدي في عزلات *K. pneumoniae* استخدمت طريقة الاقتران الجرثومي بين سلالتين من جنسين مختلفين وذلك لصعوبة الحصول على عزلتين من جرثومة *K. pneumoniae* تختلفان في عليمتين وراثيتين ، وقد اجريت عملية الاقتران بين سلالة *E.coli* المختبرية (JM83)، المقاومة للمضاد الحيوي الستربتومايسين والحساسة للمضادات الحيوية الاخرى المستخدمة في هذه الدراسة ، وعزلات *K. pneumoniae* الحساسة للمضاد الحيوي الستربتومايسين والمقاومة لمضاد حيوي واحد او اكثر من بين المضادات الحيوية المستخدمة في هذه الدراسة، وبذلك حصلنا على سلالتين جرثومية تختلفان في صفتين وراثيتين، اذ تمثل سلالة JM83 خلايا مستلمة Reciepent cells وعزلات جرثومة *K. pneumoniae* المستخدمة في الاقتران الجرثومي تمثل خلايا واهبة Donor cells. استخدمت طريقة (Olsen et al., 1992) في الاقتران الجرثومي.وتم حساب تردد الاقتران Conjugation frequencey بحسب المعادلة المستخدمة من قبل (Mohamed, 1999).

عزل DNA البلازميد وتقدير تركيزه طيفيا:

جرت تنقية الـ DNA البلازميدي من عزلات جرثومة *K. pneumoniae* باستخدام مقياس 5 مل من المزرعة الجرثومية وبحسب طريقة (Birnboim and Doly, 1979). وتم اتباع الطريقة المستخدمة من قبل Ahmed (1989) لايجاد تركيز الـ DNA البلازميدي المنقى.

اختبار قابلية الـ DNA البلازميدي على تضخيم عدد نسخه:

اتبعت طريقة (Norgard et al., 1979) لغرض تحديد قابلية الـ DNA البلازميدي الموجود في عزلات جرثومة *K. pneumoniae* على تضخيم عدد نسخهُ ومن ثم زيادة تركيزه المحضر، بعد انتهاء

فترة التحضين للمزرعة الجرثومية، تم عزل الـ DNA البلازميدي بحـسب طريقـة (Birnboim and Doly, 1979) مقياس 5 مل وتم تقدير تركيزه لغرض مقارنته مع تركيز الـ DNA البلازميدي المنقـى من المزرعة الجرثومية غير المعاملة بالمضاد الحيوي الكلورامفينيكول.

النتائج والمناقشة

مقاومة المضادات الحيوية:

اعتمدت صفة المقاومة للمضادات الحيوية لتصنيف عزلات *K. pneumoniae* المعزولة من حالات مرضية مختلفة، اذ تم فحـص الحـساسية لهـذه الـسلالات وسـلالة JM83 لخمسةمـضادات حيويـة (Cf, Sm, Cm, Tc, Ap) باستخـدام طريقة الاطباق، وقد اختيرت 5 عزلات مـن مجمـوع العـزلات الجرثومية اعتمادا على اساس اختلافها في مقاومة المضادات الحيوية المستخدمة وكما هـو مبـين فـي الجدول (1).

الجدول 1: مصادر عزلات جرثومة *K. pneumoniae* وسلالة JM83 ومقاومتهـا للمـضادات الحيويـة المستخدمة.

رقم العزلة	مصدر العزل	اوساط الاكار المغذي الحاوي على التراكيز النهائية للمضادات الحيوية مايكروغرام/مل				
		الامبسلين 50	التيتراسايكلين 15	الكلورامفينيكول 10	الستربتومايسين 25	السيفالكسين 30
1	القيح	R	R	R	S	R
2	البراز	S	R	S	S	R
3	**السائل المخي الشوكي**	R	R	R	R	R
4	البول	S	S	S	S	R
5	القشع	R	R	R	R	S
JM83	مختبرية	S	S	S	R	S

S : الحساسية للمضاد الحيوي.

R: المقاومة للمضاد الحيوي.

الاقتران الجرثومي:

لغرض التعرف على قابلية جزيئات الـ DNA البلازميـدي الموجـودة فـي عـزلات جرثومـة *K.pneumoniae* على الانتقال الذاتي، اجريت عملية الاقتران الجرثومي بين العزلات الجرثومية وسلالة JM83 واللتان تختلفان على الاقل بعليمتين وراثيتين، ويبين الجدول (2) النتائج التي تم الحصول عليها.

الجدول 2: يبين عملية الاقتران الجرثومي لعزلات *K. pneumoniae* مع سلالة JM83.

عزلات *K. pneumoniae* الواهبة		السلالة المستلمة E.coli JM83	صفة المقاومة للمضادات الحيوية في مستعمرات JM83 المقترنة عند وجودها على وسط اكار ماكونكي حاوي على المضادات الحيوية المناسبة	تردد الاقتران
رقم العزلة	صفة المقاومة للمضادات الحيوية			
1	Ap^R, Tc^R, Cm^R, Sm^S, Cf^R	Ap^S Tc^S Cm^S Sm^R Cf^S	Cf^R , Sm^R	$10^{-6}\times$ 1
2	Tc^R, Sm^S,Cf^R		Cf^R , Sm^R	10^{-6}x1.6
			Sm^R, Tc^R, Cf^R	10^{-6}x0.5
4	Sm^S, Cf^R		Cf^R, Sm^R	10^{-6}x0.5

يوضح الجدول في اعلاه بان الاقتران الجرثومي بين العزلة (1) وسلالة JM83 ادى الى انتقال صفة المقاومة للسيفالكسين الى سلالة JM83 اذ ظهرت المستعمرات المقترنة لهذه السلالة بلون اصفر على وسط اكار الماكونكي، نقيت المستعمرات المقترنة اكثر من مرة على وسط اكار الماكونكي الحاوي على السيفالسكين والستربتومايسين، وقد اخفقت هذه المستعمرات المقترنة في النمو بعد نقلها الى وسط اكار المانكوكي الحاوي على الامبسلين والتيتراسايكلين الكلورامفينيكول كلاً عل انفراد، ان عدم نمو هذه المستعمرات المقترنة بوجود المضادات المذكورة قد يعود الى ان المورثات المسؤولة عن مقاومة هذه المضادات واقعة على جزيئة DNA مستقلة عن التي تحمل المقاومة للسيفالكسين اذ ان الجزيئة الاخيرة من الـ DNA لها صفة الانتقال الذاتي في حين ان الجزيئة الاولى لا تمتلك هذه الصفة ربما لعدم احتوائها على oriT وبروتين mob ، وهذا يتفق مع ماذكره (Martinez-Martinez et al., 1996) في ان مقاومة المضادات الحيوية في جرثومة *K.pneumoniae* تكون موجودة على بلازميدات مختلفة. في حين ان المستعمرات المقترنة الناتجة من اقتران العزلة (2) مع سلالة JM83 نمت على وسط اكار الماكونكي الحاوي على الستربتومايسين والسيفالكسين بتردد (10^{-6}x1.6)، بعد تنقية هذه المستعمرات على نفس الوسط تم نقلها الى وسط اكار الماكونكي الحاوي على التيتراسايكلين ووجد بان ثلث هذه المستعمرات فقط نمت على هذا الوسط الغذائي بتردد (10^{-6} X0.5). لقد نجحت عملية الاقتران الجرثومي ايضاً بين العزلة (4) والسلالة المستلمة اذ نمت سلالة JM83 المقترنة على وسط الاكار الماكونكي بوجود المضادين الستربتومايسين والسيفالكسين. ان عملية الاقتران الجرثومي بين العزلتين (3 و 5) وسلالة JM83 لم تنجح وقد يعود السبب الى عدم امتلاك بلازميدات هاتين العزلتين صفة الانتقال الذاتي او قد يعود السبب الى عدم امتلاكهما بلازميد F.

ان انتقال صفة المقاومة للسيفالكسين من عزلات *K.pneumoniae* المختبرة في عملية الاقتران الجرثومي الى سلالة JM83 يتفق مع ماتوصل اليه (Asensio et al., 2000) اذ لاحظوا بان المورثات

المسؤولة عن تشفير مقاومة السيفالوسبورينات موجودة على بلازميدات متنقلة. فضلاً عن ذلك فان نماذج السيطرة جميعها والمستخدمة في هذه التجربة لم نلاحظ نمو أي مستعمرة من السلالتين كلتيهما الواهبة والمستلمة على وسط اكار الماكونكي الحاوي على المضادات المستخدمة بوصفها علائم وراثية كل على انفراد.

يتبين من النتائج التي توصلنا اليها ان عملية الاقتران الجرثومي بين عزلات *K. pneumoniae* وسلالة JM83 اعطت نتائج مقبولة على الرغم من ان الاخيرة هي من جنس اخر ولكنها تعود الى العائلة نفسها، من جهة اخرى فان تردد الاقتران للعزلات المقترنة تختلف من عزلة الى اخرى ولكنها بقيت ضمن الحدود الطبيعية لعملية الاقتران (10^{-6}) وقد يفسر هذا الاختلاف على اساس وظيفة نظام Restriction–Modification الذي يحلل الـ DNA لاجناس مختلفة (Markowitz et al.,1980).

قابلية الـ DNA البلازميدي على تضخيم عدد نسخه:

ان الصفة الاخرى التي درست للـ DNA البلازميدي في العزلات الجرثومية المدروسة هي قابليتها على تضخيم عدد نسخه وذلك باضافة الكلورامفينيكول بتركيز (100 مايكروغرام/مل) الى الطور اللوغارتمي لهذه العزلات وبحسب طريقة (Norgard et al., 1979) وكانت النتائج كما هو مبين في الجدول (3).

الجدول 3: تأثير اضافة الكلورامفينيكول (100 مايكروغرام/ مل) الى الطور اللوغارتمي للمزارع الجرثومية النامية لعزلات *K. pneumoniae* .

رقم العزلة	متوسط تركيز الـ DNA البلازميدي(مايكروغرام/مل) قبل اضافة الكلورامفينيكول	متوسط تركيزالـ DNA البلازميدي (مايكروغرام/مل)بعد اضافة الكلورامفينيكول
1	4.639 A*	4.7 A
2	2.497 C	2.46 C
3	0.423 E	2.307 CD
4	2.717 B	2.65 B
5	2.297 CD	4.525 A

* الارقام التي تحمل احرف مختلفة تدل على وجود فروق معنوية عند مستوى احتمال 0.05 حسب اختبار دنكن.

يتبين من الجدول (3) بان العزلتين (3 و 5) لهما القابلية على تضخيم عدد نسخهما اذ ان متوسط تركيز الـ DNA البلازميدي بعد اضافة الكلورامفينيكول اعلى من قبل اضافة الكلورامفينيكول، وقد اشار التحليل الاحصائي الى وجود فروق معنوية بين تراكيز الـ DNA المنقى من العزلتين المذكورتين قبل اضافة الكلورامفينيكول وبعدها. ان هذه الزيادة في التركيز تكون ناتجة عن تثبيط بناء

البروتين مع زيادة معدل تضاعف البلازميد اذ تصل هذه الزيادة الى الضعف في العزلة (5) والى اربعـة اضعاف تقريباً في العزلة (3) مقارنةً مع الظروف العادية للتضاعف، يتوقع ان الزيادة في تركيـز الـ DNA قد تكون ناتجة من جراء زيادة التكرارات الترادفية للمحددة r (Yagi and Clewell, 1980). وقد عزى (Azad et al., 1992) بان سبب زيادة تركيز الـ DNA البلازميدي ربما يعود الى ان كل جزيئـة بلازميد جديدة في الخلية الجرثومية بعد اضافة الكلورامفينيكول تستخدم بوصفها قالباً من قبـل انزيمـات التضاعف والتي تكون موجودة بكميات كبيرة في الخلية الجرثومية نتيجة لتوقف بناء البروتين. أمـا فـي العزلات (1 و 2 و 4) فلم توجد اية فروق معنوية لتراكيـز الـ DNA البلازميـدي قبـل اضـافة الكلورامفينيكول وبعدها وكما هو موضح في الجدول (5) وذلك لعدم قدرة هذه العزلات على زيادة عـدد نسخ بلازميداتها.

ان مقارنة النتائج التي تم الحصول عليها في هذا الاختبار مع قابلية عزلات *E. coli*. على تـضخيم عدد نسخها والمعزولة ايضاً من مصادر مختلفة (Mohamed, 1999) ,يتبين لنا بأن هناك صفة مـشتركة بين عزلات *K . pneumoniae* وعزلات *E. coli* وهو ان ليست العزلات جميعها في الجنـسين كليهمـا تظهر خاصية تضخيم عدد نسخ البلازميدات الموجودة فيها.

المصادر الاجنبية

Ahmed, K.D., 1989. The positive control of ilv C expression in *E. coli* K-12. Ph.D. Thesis, Univ. Durham, England.

Albiger, B., Hubert, J.C. and Lett, M.C., 1999. Identification of the plasmid-mobilization potential of the strain *Klebsiella pneumoniae* ozenae KlllA isolated from a polluted aquatic environment. Plasmid, Vol.41, pp.30-39.

Alvarez, D., Merino, S., Tomas, J.M., Benedi, V.J. and Alberti, S., 2000. Capsular polysaccharide is a major complement resistance factor in lipopolysaccharide O side chain-deficient *Klebsiella pneumoniae*: 953 clinical isolates Infect. Immun., 68-955.

Asensio, A., Oliver, A., Gonzalaz–Diego, P., Baquero, F., Perez-Diaz, J.C., Ros, P., Cobo, J., Palacios, M., Lasheras, D. and Canton R., 2000. Outbreak of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an intensive care unit: Antibiotic use as risk factor for colonization and Infection. Clin. infect. Dis., Vol.30, pp.55-60.

Atlas, R.M., Brown, A.E. and Parks, L.C. 1995. Laboratory Manual, Experimental microbiology. Mosby-Year Book, Inc., pp.92, 109-110, 153, 173-174.

Azad, A.K., Coote, J.G. and Prton, R., 1992. Distinct plasmid profiles of *Pasteurella haemolytica* serotypes and the characterization and amplification in *E. coli* of ampicilline resistance plasmids encoding RoB-1 beta. Lactemase. J. Gen. Microbiol., Vol.138, pp.1185-1190.

Birnboim, H.C. and Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombination plasmid DNA. Nucleic Acids Res., Vol.7, pp.1513-1524.

Clewell, D.B., 1972. Nature of Col E1 plasmi replication in *Escherichia coli* in the presence of chloramphenicol. J. Bacteriol., Vol.110, pp.667-676.

Dery, K.J., Chavideh, R., Waters, V., Chamorro, R., Tolmasky, L.S. and Tolmaske, M. E. 1997. Characterization of the replication an mobilization of the multiresistance *Klebsiella pneumoniae* plasmid pJHCMW1. Plasmid, Vol.38, pp.97-105.

Hansen, D.S., Mestre, F., Alberti, S., Hernandez-Alles, S., Alvarez, D., Domenech-Sanchez, A., Gil, J., Merino, S., Tomas, J.T. and Benedi, V.J., 1999. *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide O typing: Revision of prototype strains and O-group distribution among clinical isolates from different sources and countries. J. Clin. Microbiol., Vol.37, pp.56-62.

Ingmer, H., Miller, C.A. and Cohen, S.N., 1998. Destabilized inheritance of pSC101 and other *Escherichia coli* plasmids by DpiA,a novel two–component system regulator. Mol. Microbiol., Vol.29, pp.49-59.

Kingsman, A. and Willetts, N., 1978.The requirements for conjucal DNA synthesis in the donor strain during Flac transfer. J. Mol. Biol., Vol.122, pp.287-300.

Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C. and Winn, W. C. 1997. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology.5th ed., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA, pp.171-220.

Markowitz, S.M., Veazey, J.M., Macrina, F.L., Mayhall, C.G. and Lamb, V.A., 1980. Sequential outbreaks of infection due to *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit: Implication of a conjugative R plasmid. J. Infect. Dis., Vol.142, pp.106-111.

Martinez-Martinez, L., Hernandez, S., Alberti, S., Tomas, J.M., Benedi,V.J. and Jacoby, G.A., 1996. In vivo selection of porin–deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded–spectrum cephalosporins. Antimicrob. Agents chemother., Vol.40, pp.342-348.

Mohamed, B.G., 1999. Genetic study of *Escherichia coli* isolated from various human infection. M.Sc. Thesis, Univ. Mosul. Mosul, Iraq.

Norgard, M.V., Emigholz, K. and Monahan, J.J., 1979. Increased amplifiction of pBR322 plasmid deoxyribonucleic acid in *Escherichia coli* K12 strains RP1 and χ1776 grown in the presence of high concentrations of nucleoside. J. Bacteriol., Vol.138, pp.270-272.

Olsen, J.E., Brown, D.J., Baggesen, D.L. and Bisgaard, M., 1992. Biochemical and molecular characterzation of *Salmonella enterica* Serovar berta, and comparison of methods for typing. Epidemid. Infect., Vol.108, pp.243-260.

Yagi, Y. and Clewell, D.B., 1980. Amplification of the teracycline resistance determinant of plasmid pAMα1 in *Streptococcus faecalis*: Dependence on host recombination machinery. J. Bacteriol., Vol.143, pp.1070-1072.