



# دراسة حساسية بكتريا *Escherichia coli* للمضادات الحيوية المعزولة من التهاب المجاري البولية لدى الاطفال والكشف عن محتوى الـ DNA البلازميدي للعزلات الجرثومية باستعمال تقنية الترحيل الكهربائي

يسرى عبد الرزاق عبد الله

جامعة الموصل - كلية التربية

## الخلاصة:

تم عزل 20 جرثومة من *Escherichia coli* من الاطفال المصابين بالتهاب المجاري البولية من مستشفى الخنساء في مدينة الموصل. وشخصت العزلات بالاختبارات الكيميو حيوية والمزرعية ثم حددت انماط مقاومتها تجاه عشرة من المضادات الحيوية اذا كانت العزلات مقاومة للـ Ampicillin , Amoxicillin, Neomycin, Kanamycin, Streptomycin, Tetracycline, Nalidixic acid, Ciprofloxacin, Erythromycin, Norfloxacin, 90%, 80%, 100%, 50%, 100%, 75% , 60%, 75%, 100% , 35% على التوالي.

## معلومات البحث:

تاريخ التسليم: 2013/01/12  
تاريخ القبول: 2013/05/22  
تاريخ النشر: 2014 / 11 / 3

DOI: 10.37652/juaps.2013.97175

## الكلمات المفتاحية:

اشريشيا القولون,  
الحساسية للمضادات,  
البلازميدات.

## المقدمة

مشكلة كبيرة في الدول النامية [3] تسمى جرثومة *E. coli* بعضيات القولون وهي مسببة للكثير من الامراض مثل التهابات المجاري البولية والتهاب حويص الكلى وجرثمة الدم والاسهال عند الاطفال [4] وتنتشر إصابات المسالك البولية البكتيرية بين جميع الافراد ، وأوضحت الدراسات الحديثة خطورة تطور هذه الاصابات لاصابات اكثر ضراوة، بالإضافة إلى التكلفة الباهضة التي تنفق من قبل المستشفيات او المرضى، ففي عام 1994م قدرت تكاليف العلاج في الولايات المتحدة الامريكية بليون دولار سنوي، بينما قدرت حالات المسالك البولية بين الافراد بـ 7 مليون زائر للمستشفى، علاوة على مليون من المرضى المقيمين بالمستشفيات [5]. والهدف من البحث الحالي هو اختبار المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية التي قد تبديها العزلات الجرثومية في التهاب المجاري البولية وكذلك حساب الحجم الجزيئي للبلازميدات المختزلة من العزلات الجرثومية للـ *E. coli*.

## المواد وطرائق العمل

### 1- العزل والتشخيص

جمعت 25 عينة من عينات الادرار من المرضى المصابين بالتهاب المجاري البولية من مستشفيات ابن سينا التعليمي والخنساء في الموصل باستعمال مسحات قطنية (Cotton swabe) نقلت هذه

تبقى مشكلة مقاومة الجراثيم تجاه المضادات الحيوية عالمية بسبب كونها تزداد كلما ادخلت مضادات حيوية جديدة، وان هذه المقاومة تكون ناتجة عن اليات وراثية وغير وراثية [1] وبالنسبة للاليات الوراثية فأنها يمكن ان تكون كروموسومية أو بلازميدية الاصل. البلازميدات هي جزيئات DNA تتضاعف تلقائياً تقع خارج كروموسوم الكائن المجهرى وان هذه المقاومة المتسببة عن وجود البلازميدات تكون من خلال وجود مورثات المقاومة التي تحملها البلازميدات، والبلازميدات الحاملة للطراز المظهري (المقاومة للمضادات) تسمى R-plasmids وهي مسؤولة عن انتشار المقاومة المتعددة للمضادات بين الجراثيم، وهذه البلازميدات تتكون من جزأين عامل نقل المقاومة (Resistance Transfer Factor RTF) ومحدد المقاومة r-determinant [2].

ان الجرثومة *Escherichia coli* هي من الممرضات الرئيسية التي تسبب مشاكل صحية خطيرة نتيجة تولد المقاومة تجاه المضادات الحيوية ونتيجة للمقاومة المتعددة للمضادات فأنها أصبحت

\* Corresponding author at: Mosul University - College of Education;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5859-6212> .Mobil:777777  
E-mail address:

والمثيل الاحمر وسالبة لكل من الـ VP والسترات واليوريز وتدل هذه الاختبارات على كونها تعود الى جرثومة *E.coli* حسب [6].  
اضيف الى ذلك (6) عزلات بشكل عصيات قصيرة سالبة لصبغة كرام مستعمراتها مخاطية سالبة لاختباري الاندول والمثيل الاحمر وموجبة لاختباري الـ VP والسترات وموجبة لفحص الكتاليز وغير منتجة لانزيم الاوكسيداز، وتدل هذه الاختبارات ان هذه العزلات هي *Klebsiella pneumoniae* حسب [6].

كذلك تميزت (4) عزلات اخرى ذات لون اخضر على وسط الاكار المغذي بسبب انتاجها صبغة (Pyocyanin) اذ كانت سالبة لفحص الاندول والمثيل الاحمر والفوكس بروسكر وموجبة للسترات والكتاليز والاكسيداز وتشير هذه النتائج ان هذه العزلة هي جرثومة *Pseudomonas aeruginosa* حسب [7].

جميع عزلات الـ *E.coli* والتي كان عددها 20 عزلة جرثومية كانت مقاومة للمضادات Ampicillin, Amoxicillin, Neomycin, Kanamycin, Streptomycin, Tetracycline, Nalidixic acid, Ciprofloxacin, Erythmycin, Norfloxacin, وبالنسب 90%، 80%، 100%، 50%، 100%، 75%، 75%، 60%، 100%، 35% كما في الجدول (1). الجدول (2) يبين المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية العشرة ونمط المقاومة للمضادات للعزلات في الجدول (3).

اما توصيف الدنا البلازميدي الكهربائي في الهلام الاكاروز لمورثات المقاومة (20) عزلة من جراثيم الـ *E.coli* فإنه يبين ان هنالك 20 بلازميد مختلف لنمط المقاومة تتراوح بين 9.16 – 13.00 كيلو قاعدة (جدول 4).

اذ يتضح من صورة الهلام ان هناك حزم متميزة ومنفصلة خارجة من الحفر باتجاه القطب الموجب بعد قطعها المسافة على الهلام بعد عملية الترحيل الكهربائي لمدة (3) ساعات فولتية 50 فولت والتي تعود الى الـ DNA البلازميدي اضع الى ذلك فان هناك حزم تعود لهذه العزلات ايضا ظهرت بمستوى اقصر مما هو عليه في حزم الـ DNA البلازميدي والتي تمثل الـ DNA الكروموسومي.

#### المناقشة

ان نمط المقاومة لاكثر من مضاد حيوي في العزلات الجرثومية ربما يعود الى ان بعض المورثات مانحة المقاومة للمضادات الحيوية قادرة على التعبير عن نفسها معا وتشفير انزيمات قادرة على

العينات الى مختبر البحوث الجزيئية في كلية التربية / قسم علوم الحياة واجريت عليها الاختبارات الكيموحيوية والمزرعية مثل اختبار اختزال النترات واختبار انزيم الكتاليز واختبار انزيم الاوكسيداز واختبارات الـ IMVIC حسب [6] وحددت انماط المقاومة للمضادات حسب [7] اذ تم استخدام طريقة الاقراص والانتشار على وسط اكار مولر هنتون اذا استخدمت عشر مضادات حيوية هي:

Ampicillin, Amoxicillin, neomycin, Kanamycin, Ciprofloxacin, erythromycin, norfloxacin, Streptomycin, Tetracycline, Nalidixic acid.

#### 2- توصيف البلازميد

تم عزل البلازميد من خلايا هذه العزلات الجرثومية حسب طريقة [8] تتضمن الطريقة تلقيح 50 مل من المرق المغذي الحاوي على المضاد الحيوي المناسب وبالتركيز النهائي بمستعمرة فتية من الجرثومة المراد عزل بلازميدها وحضنت المزرعة في حاضنة هزازة بدرجة  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  لمدة 24 ساعة وبسرعة 120 دورة/دقيقة لحين وصول الكثافة الضوئية للمزرعة لاكثر من 1 عند طول موجي 600 نانوميتر وذلك باستخدام جهاز المطياف الضوئي للاشعة المرئية.

رسبت الخلايا الجرثومية بالنبذ المركزي لمدة 15 دقيقة بجهاز الطرد المركزي وعند سرعة ترسيب 8000 دورة/دقيقة وعلق الراسب باضافة المحاليل المستخدمة لعزل البلازميد بمقادير مختلفة ثم اجري النبذ المركزي لمدة 10 دقائق وبسرعة (8000 دورة/دقيقة) وبعد الانتهاء من اضافة المحاليل المستخدمة تم غسل الراسب باضافة 5 مل من محلول الميثانول (70%) وعلق الراسب باضافة 0.5 مل من المحلول المنظم TE buffer وحفظ بدرجة  $(-20^\circ\text{C})$ .

ورحلت كهربائيا بهلام الاكاروز حيث تم تحضير هلام الاكاروز بنسبة (0.8%) حسب طريقة [9] ثم بعدها تم تحميل نماذج الـ DNA البلازميدي في هلام الاكاروز بعدها نقلت قطعة الهلام الى جهاز التألق الاشعاعي الموجود داخل غرفة مظلمة ثم صورت قطعة الهلام باستخدام كاميرا رقمية واستخدم الـ DNA كمؤشر للحجم.

#### النتائج

بعد جمع (25) عينة من عينات الادرار واجريت عليها الاختبارات الكيموحيوية والمزرعية ظهرت (30) عزلة جرثومية من العينات التي تم جمعها، اذ كانت (20) عزلة سالبة لصبغة كرام، مختزلة للنترات، سالبة للاوكسيداز، وموجبة للكتاليز، موجبة للانندول

وتقاوم الجراثيم المضادات بالطفرات الكروموسومية أو بواسطة انتقال مورثات المقاومة بالتحول الوراثي والاقتران عن طريق البلازميدات [14] وقد اشار [15] وفي دراسته على التهاب المجاري البولية في امريكا إلى المقاومة العالية تجاه المضادات وان الاستخدام الواسع وغير المحدد بوصفة طبية هو من العوامل التي تساهم من تغير انماط المقاومة في الجراثيم.

اما بالنسبة للحزم التي ظهرت بمستوى واحد وبمسافة واحدة في الهلام وتحركت بمسافة اقصر مما هو عليه في حزم الـ DNA البلازميدي والتي تمثل الـ DNA الكروموسومي ربما يعود ذلك الى ان الـ DNA البلازميدي اقتحم الكروموسوم واندمج معه واصبح جزء منه لذلك لا يظهر بشكل منفصل ولكن تظهر لهذه العزلات تعبيرات للمقاومة للمضادات الحيوية [16].

#### المصادر

- 1-Patwary, A.K. (1994). Multidrug resistance shigella infections in children. J. Diarrhoel. Dis. Res. 12: 182-186.
- 2-Hardy, K.G.; Plasmids. (1993). Oxford University press, Oxford.
- 3-Winkur, P.L.; Vonstein, D.L.; Hoffman, L.J.; Uhlenhoop, E.K.; Doern, G.V. (2001). Evidence for transfer of CMY-2 AMPC-lactamase plasmids between E.coli and salmonella isolates in food, animals and humans. Antimicrob. Chemother., 45(10): 2716-2722.
- 4-Yah, S.C.; Eghafona, N.O.; Enabulele, I.O. and Aluyi, H.S.A.(2006). Ampicillin usage and ampicillin resistance (Ampr) plasmids mediated E. coli isolated from diarrheagenic patients attending some teaching hospitals in Nigeria. Shinaz emedical Journal J., 7 (4): 15-30.
- 5-Kunin, C.M. (1994). Urinary tract infections in females. Clin. Infect. Dis. 18:1-12.
- 6-Koneman, E.W.; Allen, S.D.; Janda, W.M.; Schreckenberger, P.C. and Winn, W.C. (2007). Colour Atlas and textbook of Diagnostic Microbiology 5th ed., Lippincott Raven Publishers, Philadelphia, USA.
- 7- Ramos, J. and Levesque, R. (2006). Pseudomonas, Springs, Netherland.
- 8-Vandepitte, J.; Verhaegen, J.; Engback, K.; Rohner, P.; Piot, P. and Heuck, C.C. (2003). Basic

تحطيم المضادات الحيوية وبذلك ظهور المقاومة يدعم احتمال تواجد هذه المورثات على نفس جزيئة DNA البلازميدي في الخلية الجرثومية. وعندما تقاوم العزلات الجرثومية اكثر من مضادين او ثلاثة تعتبر هذه العزلات ذات مقاومة متعددة للمضادات الحيوية وهذا يرجع الى كون العزلات من بيبئات المستشفيات الملوثة والتي تكون ذات تعرض عالٍ للمضادات في تلك البيئات مع انتشار المقاومة بواسطة البلازميدات بالاقتران.

وتم توصيف البلازميدات الحاملة لمورثات المقاومة لعشرين عزلة من جراثيم *E. coli* من المصابين بالتهاب المجاري البولية والتي تم تشخيصها بالاختبارات المظهرية والكيموحيوية وتم اختبار حساسية هذه العزلات الجرثومية تجاه المضادات الحيوية بهدف الوصول إلى انماط المقاومة اذ اخذت عشر من المضادات الحيوية الشائعة الاستخدام.

ويلاحظ انماط المقاومة المختلفة التي تبديها العزلات من مضاد إلى اخر وبمدى تتراوح بين 35%- 100% وهي تماثل ما حصل عليه [10، 11] اذا كانت العزلات مقاومة للمضادات على الاقل منها Tetracycline, Ampicillin, Chloramphenicol, وان اختبار مقاومة هذه الجراثيم تجاه هذه المضادات الشائعة مهم جداً كون تعاطيها يمكن ان يغير من التوازن المايكروبي في امعاء الانسان ويحثها على اكتساب المقاومة عزل البلازميد من هذه الجراثيم المقاومة ورحل بهلام الاكاروز ويلاحظ ان حجم هذه البلازميدات للعزلات يتراوح من 13,000 كيلو قاعدة وهذا يماثل ما حصل عليه [11] وبين ان كل من هذه العزلات احتوت على بلازميد واحد للمقاومة.

درس كل من الباحثين [12] التهاب المجاري البولية في فلسطين وكانت عزلات جرثومة *E.coil* ذات مقاومة عالية للمضادات Amoxicillin, Methprim, Tetracycline, Gentamicin, Cephalexin وبين 100%, 100%, 82%, 46% على التوالي وقد اشار الباحثان على ان هذه المقاومة محمولة على البلازميدات كما ان الباحث [13] قد وجد ان بلازميد *E.coli* المعزولة من المصابين بالتهاب المجاري البولية في مستشفيات الاردن تحتوي 13 بلازميد مختلفة الاحجام وبالمدى 2- 49.4 كيلو قاعدة ويشفر للعديد من المضادات الحيوية منها:

Ampicillin, Nalidixic acid, Norfloxacin, Tetracycline.

antimicrobial surveillance program. (1983). J. Antimicrob. Chemother., 45: 295-303.

جدول (1) مقاومة عزلات الـ *E.coli* للمضادات الحيوية معبرا عنها بالعدد

والنسب المئوية

النسبة المئوية المقاومة %	العدد	المضاد
90	18	Ampicillin
80	16	Amoxicillin
100	20	Neomycin
50	10	Kanamycin
100	20	Streptomycin
75	15	Tetracycline
75	15	Nalidixic acid
60	12	Ciprofloxacin
100	20	Erythromycin
35	7	Norfloxacin

جدول (2) المقاومة المتعددة لعزلات الـ *E.coli* للمضادات الحيوية

النسبة المئوية للجراثيم المقاومة %	عدد المضادات الحيوية
100	1
100	1>
100	2>
100	3>
100	4>
100	5>
100	6>
100	7>
100	8>
14	9>
0	10>

جدول (3) نمط المقاومة للمضادات الحيوية للعزلات الجرثومية

نمط المقاومة	رقم العزلات
Amp, Amx, Neo, kan, Str, Ery	1
Amp, Amx, Neo, kan, Str, Ery, Tc	2
Neo, Str, Tc, Na, Cp, Ery, Nor	3
Neo, Str, Tc, Na, Cp, Ery, Nor	4
Amp, Amx, Neo, Str, Tc, Na, Ery, Nor	5
Amp, Amx, Kan, Str, Tc, Na, Ery, Neo	6
Amp, Amx, Neo, Str, Tc, Na, Ery	7
Amp, Amx, Neo, Str, Tc, Na, Cp, Ery	8
Amp, Neo, Kan, Str, Tc, Na, Cp, Ery	9
Amp, Neo, Kan, Str, Tc, Na, Ery	10
Amp, Amx, Neo, Str, Cp, Ery	11
Amp, Amx, Neo, Kan, Str, Tc, , Na, Nor, Ery	12
Amp, Amx, Neo, Str, Tc, Na, Cp, Ery	13
Amp, Amx, Neo, Kan, Str, Tc, Na, Cp, Ery	14
Amp, Amx, Neo, Kan, Str, Tc, Na, Cp, Ery	15
Amp, Amx, Neo, Ery, Nor, Str	16
Amp, Amx, Neo, Kan, Str, Tc, Na, Ery	17
Amp, Amx, Neo, Str, Tc, Na, Cp, Ery	18
Amp, Amx, Neo, Str, Tc, Na, Ery, Nor	19
Amp, Amx, Neo, Kan, Str, Tc, Na, Cp, Ery	20

Amp = Ampicillin, Amx= Amoxicillin, Neo = Neomycin, Kan= Kanamycin,  
Str =Streptomycin, Ery = Erythromyan, Cp= Ciprofloxacin  
Tc = Tetracycline, Na = Nalidixic acid , Nor= Norfloxacin

laboratory procedures in clinical bacteriology. World Health Organization, Geneva.

9-Brinboiom, H.C.; Doly, J. (1979). Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acid Res., 7:1513-1524.

10-Meyer's; J. A.; Sanchez, D.; Elewell, O., Falkow, (1976). Simple agrose gel electrophoretic method. For identification and characterization of plasmid deoxy ribonucleic acid, J. Bacteriol. 127: 1529-1537.

11- LIU Yan, ZHANG Bi-Li, WANG Wen-Hong, ZHANG Xuan, FAN Shu-Ying, LI Li, (2011). Antibiotic resistance of pathogens isolated from 181 children with complicated urinary tract infection Vol. 13 » Issue (5): 381-384

12-Azad, A. K., Shahjahn, M. (1999). Molecular characterization of chloramphenicol resistance gene in Escherichia coli for urinary tract infections. M. Sc. Thesis, Department of Biochemistry, University of Rajshahi, Bangladesh.

13-Martinez, L. Y.; Arenas, MMp., Montes, MYR., Martinez, L. J., Baca, BE. (1987). Antibiotic resistance and plasmid pattern of enter toxigenic ST-a Strains of Escherichia Coli isolated in Puebla, mexico, Can. J. Microbiology , 33: 816-819.

14-Sharif, F.A.; Astal, Z.Y. (2004). Role of plasmids in mediating antibiotic resistance and extended-spectrum beta- lactamase production in Escherichia coli. J. Islamic University of Gaza 12(2): 1-8.

15-Shehabi, A.A. Mahafzah, A.M. and AL- Khalili, K.Z. (2004). Antimicrobial resistance and plasmid profiles of urinary Escherichia coli isolates from Jordanian patients. East. Mediterr. Health J., 10(3): 322- 328.

16- Seow Ven Lee and Abdul Rani Bahaman (2012), Discriminatory Power of Agarose Gel Electrophoresis in DNA Fragments Analysis , Putra University Malaysia.

17-Kapil, A. (2005). The challenge of antibiotic resistance: need to contemplate Indian J. Med. Res. 121: 83-91.

18-Gales, A.C. (2000). Activity and spectrum of 22 antimicrobial agents tested against urinary tract infection pathogens in hospitalized patients in latin America report from second year of sanitary

9.3	11
10.18	12
11.19	13
9.16	14
9.16	15
11.19	16
11.19	17
12.2	18
13	19
12.45	20

جدول(4): الحجم الجزئي للبلازميدات المختزلة عن بكتريا E.coli المعزولة

من التهابات المجاري البولية

رقم العزلات	الحجم الجزئي(كيلو قاعدة)
1	10.18
2	11.19
3	9.18
4	9.162
5	11.19
6	11.19
7	10.12
8	12.21
9	10.18
10	11.19

## STUDY OF ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF *Escherichia coli* OF ANTIBIOTICS ISOLATED FROM URINARY TRACT INFECTIONS OF CHILDREN AND DETECTION OF PLASMID DNA CONTENT IN BACTERIAL ISOLATES BY GEL ELECTROPHORESIS TECHNIQUE

YOUSRAH A.ABDULLAH

### ABSTRACT

Twenty bacterial were isolated of *Escherichia coli* from children with urinary tracts infection. These isolates were identified by cultural and biochemical tests and Antibiotic susceptibility tests were carried out to determine their resistance patterns so they were 75%, 100%, 50%, 100%, 80%, 90%, 75%, 60%, 100% and 35% resistant to Ampicillin, Amoxicillin, Neomycin, Kanamycin, Streptomycin, Tetracycline, Nalidixic acid, Ciprofloxacin, Erythromycin, Norefloxacin respectively.