تحديد المحتوى البلازميدي للبكتريا المعزولة من اصابات التهابات المجاري البولية

استبرق محمد علي سلمان قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ الجامعه المستنصرية

الخلاصة :

تناولت الدراسه اختبار 30 عينه ادرار من اصابات التهابات المجاري البولية للفترة من شهر اذار 2008 ولغاية ايلول 2008 من المختبرات التعليمية في مدينة بغداد التعليمة. زرعت العينات على وسطي اكار الدم واكار ماكونكي ثم شخصت العزلات اعتمادا على عدد من الفحوصات المورفولوجية والبايوكيميائية فضلا عن استخدام نظام api 20 E. تم الحصول على 16 عزلة 14 عزلة منها تعود الى بكتريا *Escherichia coli* وعزلتان تعود الى بكتريا *Staphylococcus aureus*. اختبرت حساسية العزلات قيد الدراسة لعدد من مضادات الحياة الشائعة الاستعمال واظهرت النتائج وجود مقاومة عالية لبكتريا *E.coli* لمضادي Ampicillin, Cephalexine بنسبة بلغت 92.8%، اما Erythromycin, Rifampin فقد بلغت نسبة المقاومة لهما 85.7% في حين اظهرت حساسية لكل من Amikacin, Gentamicin, ciprofloxacin, Norfloxacin بنسبة 100% في حين كانت الحساسية بالنسبة لمضاد Nalidixid acid 50% ولمضاد Chloramphenicol 85.7% اما بكتريا *Staphylococcus aureus* فقد اظهرت العزلتان حساسية عالية وبنسبة 100% لكل من Chloramphenicol, Trimethoprim, Amikacin, Gentamicin بينما اظهرتا مقاومة عالية لكل من مضادي Cephalexine, Streptomycin بنسبة 100%.كما تم عزل الدنا البلازميدي للعزلات قيد الدراسة وبينت النتائج احتواء عزلات E.coli 6, 9, 13 على حزمة بلازميدية واحدة بينما العزلات E.coli 7, 10, 11 فقد احتوت على حزمتين بلازميديتين ، اما بكتريا *Staphylococcus aureus* فقد احتوت العزلة *Staphylococcus aureus 2* على حزمة بلازميدية واحدة فيما خلت العزلة الأخرة من البلازميدات وقد لوحظ ايضا مقاومة العزلات الحاوية على البلازميدات العديد من مضادات الحياة المستخدمة ضمن الدراسة.

المقدمه-

تشكل التهابات المجاري البولية واحدة من اخطر المشاكل الصحية التي يمكن ان تواجه ملايين البشر في كل عام ، وتعتبر الأحياء المجهرية وخاصة البكتريا السبب الرئيسي لأصابات الألتهابات المجاري البولية وتعد بكتريا *Esclerichia coli* المسبب الرئيسي لألتهابات المجاري البولية اذ تشكل 85 – 90 % اما بكتريا *Staphylococcus* فتشكل 5- 10% من الأصابات (*Ehinmidu,2003*). تمتلك بكتريا *E.coli* العديد من عوامل الضراوة التي تسهل عملية غزو النسيج وتلف الخلايا الظاهرية والحشوية للنبيبات الكلوية منها افراز الهيمولاسين الذي يحلل الدم والذي تنتجة معظم السلالات الممرضة للمجرى البولي اضافة لأنتاجها الذيفان المعوي Enterotoxin (Brooks *et al.*,2007) وتعتمد شدة الأصابة على امتلائها لعوامل الضراوة من ناحية ومن ناحية اخرى على طبيعة الأجزة الدفاعية لدى المضيف (*Bass et al., 2003*). مضادات الحياة لها اثر كبير في القضاء على الأحياء المجهرية اما بصورة مباشرة او بأيقاف نموها لكي يتغلب عليها الجهاز المناعي في الجسم، وتمتلك هذه الأحياء القدرة على التكيف والدفاع عن نفسها ضد المضادات بطرق مختلفة والتي تقلل من فعالية المضاد خصوصا اذا تم استخدام المضاد الحيوي عشوائيا او بجرعة او مدة غير كافية وبالتالي تظهر سلالات من الاحياء المجهرية لها القدرة على مقاومة مضادات الحياة، اضافة الى دور البلازميدات والعوامل الوراثية القافزة الحاملة لجينات المقاومة والتي تعمل على نشرها بين البكتريا المحيطة عن طريق الأقتران والتحويل (Transformation) او التوصيل الوراثي (Transduction) والتي لها دورا في ظهور السلالات الطافرة (*Siderak et al.,2001*)، لذا جاءت هذه الدراسة تهدف الى عزل وتشخيص بعض انواع البكترية المسببة لأصابات التهابات المجاري البولية ودراسة حساسيتها لبعض مضادات الحياة وعلاقة ذلك وراثيا.

المواد وطرائق العمل (Material and Methods):

جمع العينات المرضية :-جمعت 30 عينة ادرار من اصابات التهابات المجاري البولية للفترة من شهر اذار 2008 ولغاية ايلول 2008 من المختبرات التعليمية في مدينة بغداد الطبية زرعت على وسطي اكار الدم واكار ماكونكي وحضنت بدرجة 37 c° لمدة 24hr ثم شخصت العزلات بأستخدام الفحوصات المورفولوجية والبايوكيميائية وحسب ماورد في (*Baron et al.,2004*).

حساسية العزلات البكتيرية لمضادات الحياة :-استخدمت طريقة (CLSI.,2007) القياسية لأختبار حساسية العزلات قيد الدراسة لمضادات الحياة بأستخدام وسط اكار مولر – هنتون، اذا تم استخدام المضادات الأتية:-

1	Ampicillin	AM	10 µg	Mast (ENGLAND)
2	Amiukacin	Ak	30 µg	Mast
3	Cefotaxim	CTX	30 µg	Mast
4	Cephalexine	KF	50 µg	Mast
5	Ciprofloxacin	CIP	5 µg	Mast
6	Chloramphenicol	C	30 µg	Mast
7	Erythromycin	E	15 µg	Mast
8	Gentamicin	CN	10 µg	Mast
9	Nalidixic acid	NA	30 µg	Mast
10	Norfloxacin	NoR	10 µg	Mast
11	Rifampin	RA	5 µg	Mast
12	Streptomycin	S	10 µg	Mast
13	Tetracycline	T	30 µg	Mast
14	Trimethoprim	TMP	15 µg	Mast

عزل الدنا البلازميدي

تم عزل الدنا البلازميدي لجميع العزلات قيد الدراسة بأستخدام طريقة (*Crosa et al.,1994*)، اذا رحلت البلازميدات في هلام الأكاردز بتركيز 0.7% المضاف اليه 10 مايكروليتر من صبغة بروميد الأثيديوم بتركيز نهائي 0.5مايكروغرام/مل بعد اضافة 5 مايكروليتر من دارئ التحميل loading buffer اليها بأمرار تيار كهربائي كهربائي بفرق جهد 7 فولت/سم^2 ولمدة 1-2 ساعه، بعدها فحص الهلام بأستخدام مصدر للأشعة فوق البنفسجية (U.V. Transillumnator) عند طول موجي 336 نانوميتر. صور بعدها الهلام بأستخدام كاميرا اعتيادية مزودة بفلتير خاص.

النتائج و المناقشة :-

ا ظهرت نتائج العزل والتشخيص الحصول على 16 عزلة 14 عزلة منه تعود الى بكتريا *Escherichia coli* وعزلتين تعود الى بكتريا *Staphyloccus aureus* من مجموع 30 عينة ادرار اعتمادا على الفحوصات المورفولوجية والزرعية والبايوكيميائية وحسب ماورد في (Baron *et al.*,2004) وتتفق هذه الدراسه مع ماشار الية (عبد الكريم،2008) في بحثه الى ان بكتيريا *E.coli* كانت بنسبة 37.5% من مجموع 32 عزلة من بين المسببات المرضية المسببة لالتهابات المجاري البولية أما بكتيريا *Staph. aureus* فبلغت نسبتها 9.37% كما اشارت الكثير من الدراسات الى ان مسببات التهابات المجاري البولية يعود الى بكتيريا *E.coli* و *Proteus* وبنسبة اقل للاجناس الاخرى التابعة للعائلة المعوية والبكتريا الموجبة لصبغة كرام (الحميداوي،2005). وبين (Forbs *et al.*,2002) الى ان كثير من المكورات الموجبة لصبة كرام والتي تعد جزء من الفلورا الطبيعية ممكن ان تتسبب في احداث اصابات متكررة في الجهاز البولي مثل بكتريا *Enterococcus Faecalis* كما

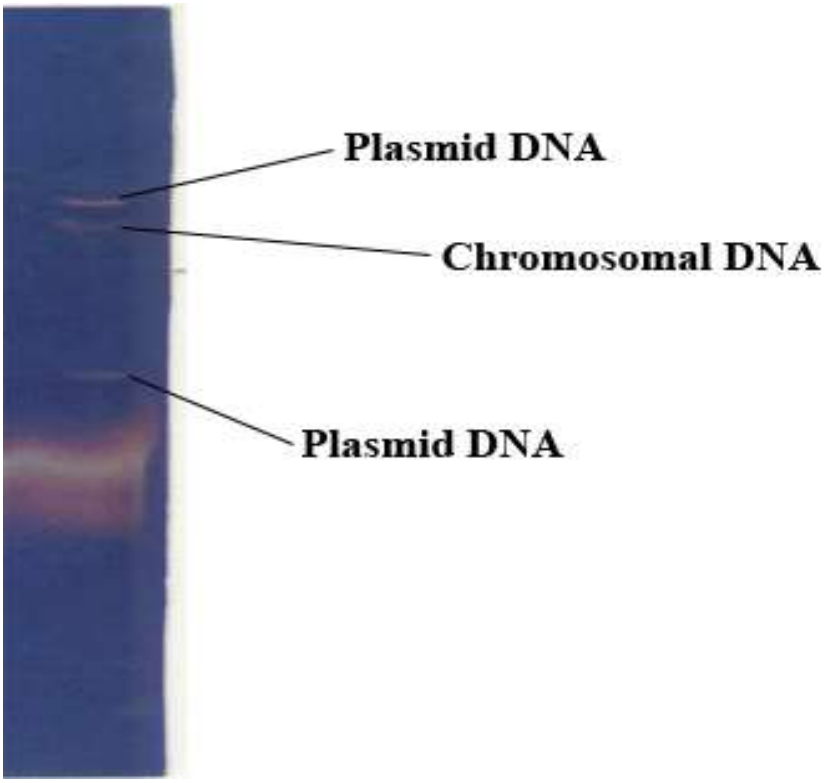
اوضح (Reinhard *et al*.,2006) ان نسبة 80-90% من التهابات المجاري البولية هي بسبب بكتريا *E.coli* وان باقي انواع البكتريا التابعة للعائلة المعوية والبكتريا الموجبة لصبغة كرام تحتل المتبقي من هذه النسبة وهذا يدل على ان سهولة الأصابة بهذا النوع البكتري مرتبطة بعوامل الضرواة لهذه البكتريا وقدرتها على تكوين الأصابة بسبب سهولة التصاقها بالخلايا المبطنة للمجرى البولي وماتمتلكه من انزيمات مدمرة للخلايا الطلائية مثل الأنزيم الحال للدم(α-Haemolysin).بينت نتائج اختبار فحص الحساسية لمضادات الحياة مقاومة معظم عزلات *E.coli* لمضادات ال Ampicillin, Cephalexine وبنسبة 92.8% اما مضادي Erythromycin, Rifampin فقد بلغت نسبة المقاومة لهما 85.7% (جدول 1)، في حين اظهرت مقاومة لمضادات ال Streptomycin,Cefotaxime, Trimethoprim, Tetracycline, Nalidixic وبنسب 50%، 42.8%، 35.7%،50%، 35.7%، على التوالي كما اظهرت العزلة *E.coli 2* حساسية متوسطة لمضاد ال Streptomycin بينما عزلة *E.coli 3* اظهرت حساسية متوسطة ل Cefotaxime,Tetracycline, وعزلة *E.coli* 4 اظهرت الحساسية المتوسطة للTetracycline والعزلة *E.coli 7* لمضادات Nalidixic acid, Cefotaxime, Cephalexine الذي يعد فعال في العلاج ضد البكتريا السالبة لصبغة كرام والمتخصص في علاج التهابات المجاري البولية بسبب ارتفاع تركيزة في الأدرار.

اما مضادات Tetracycline, Chloramphenicole, Cefotaxime فقد اظهرت عزلة *E.coli 12* حساسية متوسطة لها.

اشار [عبد الكريم،2008] في بحثة الى مقاومة عزلات ال *E.coli* المعزوله في اصابات التهابات المجاري البولية لمضادات ال Ampicillin وبنسبة 100% وبنسبة اقل لمضاد Cefotaxime وهذا يتفق مع نتائج هذه الدراسة وقد يعود سبب المقاومة الى انتاج العزلات انزيمات البتالاكتاميز Extended- Spectrum beta lactamase التي تحطم حلقة البيتالاكتام للمضاد ويجعلها غير فعالة بايولوجيا [Salyerset *et al*.,2004]، وقد يشفر انتاج انزيمات *البيتالاكتاميز* بلازميدا اذا بينت نتائج عزل الدنا البلازميدي (شكل 1) احتواء عزلات *E.coli* 6,9,13 على حزمة بلازميدية واحده وقد قاومت هذه العزلات لمضادات Cefotaxime, Cephalexine, Ampicillin اضافة لمضادات Trimethoprim, Tetracycline, Nalidixic acid, Rifampin, Erythromycin, Streptomycin اما عزلات ال *E.coli* 7,10,11 فقد احتوت حزمتين بلازميديتين واظهرت مقاومه عالية لمعظم المضادات وقد بين [Uma *et al*.,2009] ازدياد المقاومة لمضادات الحياة بين عزلات ال *E.coli* من خلال حدوث عملية الأقتران البكتيري والذي يشكل سببا في نقل البلازميدات وبالتالي المقاومه للمضادات وبشكل سريع جدا، كما اشارايضا الى مقاومة عزلات ال *E.coli* المعزولة من اصابات الألتهابات المجاري البولية لل Tetracycline, Streptomycin, Erythromycin.فيما كانت العزلات حساسة لمضادات Gentamicin, Norfloxacin, Ciprofloxacin ومضاد ال Amikacin بنسبة 100% ولمضاد ال Chloramphenicole بنسبة 92.8% وهذه الدراسة لا تتفق مع ما اشار الية [طلحه،2009] في دراسته على بكتريا *E.coli* المعزولة من اصابات التهاب المجاري البولية اذاشار الى وجود مقاومة وبنسب مختلفة تجاه مضاد ال Norfloxacin, Ciprofloxacin، وهذا قد يعود الى الأستخدام العشوائي والشائع اهذه المضادات من قبل المرضى المصابين بالتهاب المجاري البولية، كما اشار الى وجود مقاومة لمضاد ال Gentamicin بنسبة بلغت 92.9% بينما اشار [Uma *et al*.,2009] الى حساسية العزلات لل Gentamicin, Ciprofloxacin بنسب 93.75% ، 78.69% على التوالي بينما كانت حساسيتها لمضاد ال Amikacin كانت بنسبة 3.12%.اما بالنسبة لبكتريا *Staphylococcus aureus* فقد اظهرت العزلتان مقاومة لكل من Streptomycin, Cephalexine بنسبة 100% (جدول 1) ، في حين كانت حساسة لكل من ال Trimethoprim, Chloramphenicol, Gentamicin, Amikacin بنسبة 100%، بينما العزلة الأولى لهذه البكتريا اظهرت حساسية متوسطة لل Cefotaxime, Nalidixic اما العزلة الثانية فقد اظهرت حساسية متوسطة لمضاد ال Tetracycline، كما اظهرت نتائج عزل الدنا البلازميدي احتواء العزلة رقم 2لبكتريا ال *Staphylococcus aureus* على حزمة بلازميدية واحدة بينما خلت العزلة الأخرى من البلازميدات وقد قاومت العزلة الحاوية على البلازميد معظم المضادات مثل Norfloxacin, Ciprofloxacin, Cephalexine, Erythromycin, Cefotaxime, Rifampin, Ampicillin, Streptomycin، وقد اشار (Salyers *et al*.,2004) الى ان المقاومة لمضادات الحياة قد تحدث بين الأنواع البكتيرية المختلفة كما يحدث بين بكتريا *E.coli* وبكتريا ال *Staplylococcus* وذلك من خلال الجينات المسؤولة عن انتقال صفة المقاومة لمضادات الحياة من خلال عملية النتقال الجينات افقيا Horizontal gene Transfer، وغالبا ما تحمل بكتريا ال *E.coli* بلازميدات المقاومة للمضادات ويمكن ان تنتقل هذه البلاوميدات الى انواع بكتيرية اخرى كبكتريا ال *Staphylococcus* لذلك تعتبر بكتريا *E.coli* وباقي انواع البكتريا المعوية Enterobacteria مخازن مهمة لنقل صفة المقاومة لمضادات الحياة.

جدول (1) حساسية العزلات قيد الدراسة لمضادات الحياة

	S	C	NA	T	AK	Tmp	Am	RA	CTX	E	KF	CN	Cip	NOR
E.Coli 1	S	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S
E.Coli 2	I	S	S	R	S	S	R	R	S	R	R	S	S	S
E.Coli 3	S	S	S	I	S	S	R	R	I	R	R	S	S	S
E.Coli 4	S	S	S	I	S	S	R	R	S	R	R	S	S	S
E.Coli 5	R	S	S	S	S	R	R	S	R	R	R	S	S	S
E.Coli 6	R	S	S	S	S	S	R	R	S	R	R	S	S	S
E.Coli 7	R	S	I	S	S	S	S	S	I	S	I	S	S	S
E.Coli 8	S	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S
E.Coli 9	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S
E.Coli 10	R	S	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	S	S
E.Coli 11	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S
E.Coli 12	S	I	R		S	R	R	R	I	R	R	S	S	S
E.Coli 13	R	S	S	S	S	S	R	R	S	R	R	S	S	S
E.Coli 14	R	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	S	S	S
Staph. aureus 1	R	S	I	S	S	S	S	S	I	S	R	S	S	S
Staph. aureus 2	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R



شكل (1) المحتوى البلازميدي للعزلة 11 *E.coli*

المصادر:-

Baron, E.J, Lancer, R. Pand Sydney, M.F. Diagnostic Microbiology 10th ed. Balley and Scotts. Mosby Co. Battimor, Boston (2004).

Bass, P.F, Jarvis, J.A. and Mitchell, C.K. Urinary tract infection, Prim Care, 30 (3): 41—61(2003).

Bauer, A.W., Kirby , W. M. , Sherris, J.C and Turch, M. Antibiotic susceptibility testing by standardized diskmethod. Clin. Patho., 45: 493- 496 (1966).

Brooks, G.F, Butel, J.S. and Morse, S.A.: Jawetz, Melnick and Adelbergs Medical Microbiology 24th ed, Appelton and Lange (2007).

Clinical and Laboratory standards Institute. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational Supplement. (2007).

Crosa, J.H., Tolmasky, M.E, Actis, L.A and Falkow, S.(Plasmids In: Gerhardt, P, Murray, R.G.E, Wood, W.A, Kreig. N and Reditors.) Methods for General and Molecular Bacteriology . American Society for Microbiology, Washington: 365-386 (1994).

Ehinmidu, J.O. Antibiotics susceptibility patterns of urine bacterial isolates in Zaria, Nigeria. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2(2) : 223 – 228 (2003).

Forbs, B.A, Sahm, D.F. and Weissfeld, A.S. Baily and Scott's Diagnostic Microbiology. (11th ed). Mosby, (2002).

Reinhard, F,Undine, O.and Kurt, G.N. International Journal of Antimicrobial Agents, 28(1): 72-77 (2006).

Salyers, A.A, Gupta, A. and Wang, Y. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. Trends. Microbiol. 12(9) : 412 – 416 (2004).

Siderak, V., Huang, W., Palzkill, T. and Gibert, F. Asecondary drug resistance mutation of TEM.- β –Lactamase that suppresses misfiling and aggregation . Proc. Nati Aced. Sci USA : 198 (2001).

Uma, B, Prabhakar, K., Rajendran, S., Kavitha, K. and Sarayn, Y.L. Antibiotic Sensitivity and plasmid profiles of Escherichia coli isolated from pediatric Diarrhea. J. Glob. Infect, Dis., 1(2) : 107-110 (2009).

الحميداوي، طالب فالح حسن. النشاط الهيمولايسيني لبكتريا ايشرسيثيا القولون المسببة لألتهاب المجاري البولية ومقاومتها لمضادات الحياة . اطروحة دكتوراة . كلية العلوم. الجامعة المستنصرية(2005).

طلحه، مصطفى حسن زينل. مقارنة النشاط الأنزيمي لبكتريا Echerichia المعزولة من ورضى التهاب المجاري البولية للمصابين وغير المصابين بالعجز الكلوي. رسالة ماجستير. كلية العلوم. الجامعة المستنصرية(2009).

عبد الكريم، رائد خماس. تأثير راشح ومستخلص Pseudomonas Fluorescens في بعض مسببات التهاب المجاري البولية. مجلة علوم المستنصرية.المجلد 19، العدد 7 (2008).

Abstract:-

The study conclued with 30 samples of urine from urinary tract infection were collected the period of March 2008 to September 2008 that belongs to the clinical diagnostic laboratories of Baghdad city hospital of Samples were cultured on blood agar and MacConky agar then isolates were diagnosted according to a number of morphological and biochemical test in addition to use api 20 E system. sixteenth isolates were achieved , 14 of them is belonge to *Escherichia coli*, 2 of them is belonge to *staphylococcus aureus* bacteria; Bacterial isolates in current study were tested for antimicrobial susceptibility and results showed that *E. coli* was highly resistance to Ampicillin and Cephalexine 92.8 %, while Rifampin and Erethromycin is reached 85.7% from but sensitivity towards Norfloxacin, Ciprofloxacin, Gentamicin and Amikacin 100%, while in Nalidixin acid the sensitivity was 50% and in chloramphenicole 85.7%. The two isolates of *Staphylococcus aureus* bacteria was appeared highly sensitivity 100% towards Gentamicin, Amikacin , Trimethoprim and chloramphenicole, but they were showed highly resistance 100% for each streptomycin and Cephalexine. DNA of plasmid of isolates in current study was isolated and results showed that *E.coli* 6, 9, 14 had one bands of plasmid DNA , while *E.coli* 7, 10, 11, had two bands plasmid. The isolates number 2 of *Staphylococcus aureus* had one band of plasmid, and other isolate had no plasmid. Also we noticed resistance of isolates that have plasmids to many antibiotics used in the study.