

إمكانية إنتقال صفة مقاومة المضادات الحيوية والمعادن الثقيلة بعملية الإقتران الوراثي
في بكتريا *Klebsiella pneumonia*

د.عباس عبود فرحان الدليمي ، د.هادي رحمن رشيد الطائي، إيمان عباس علي الزنكنة

إمكانية إنتقال صفة مقاومة المضادات الحيوية والمعادن الثقيلة بعملية الإقتران الوراثي في بكتريا *Klebsiella pneumonia*

د.عباس عبود فرحان الدليمي ، د.هادي رحمن رشيد الطائي، إيمان عباس علي الزنكنة

الخلاصة

نُشِطت ٢٢ عزلة لبكتريا *K.pneumoniae* المعزولة سابقاً من أصابات مرضية مختلفة (التهابات مجاري بولية ، حروق ، جروح ، قشع) وذلك بتنميتها على وسط Brain Heart Infusion Broth ثم أجريت عملية الكشف عن إنتاج البكتريا لأنزيمات البيتا لاكتاميز β -Lactamase .

أظهرت نتائج هذه الدراسة ان ١٩ عزلة (٨٦.٤%) لها القابلية على إنتاج أنزيمات البيتا لاكتاميز، و كان ٩ عزلات لها القابلية على إنتاج أنزيمات البيتا لاكتاميز الواسعة الطيف و بنسبة (٤٠.٩%)، وكانت ١٢ عزلة (٥٤.٥%) قادرة على إنتاج أنزيمات البيتا لاكتاميز المعدنية.

اختبرت حساسية العزلات نمط المقاومة المتعددة تجاه ١٦ مضاداً حيوياً، وكانت جميع العزلات وبنسبة ١٠٠% مقاومة لمضادات الامبيسلين، و الكاربينسلين، والبراسيلين، في حين كانت معظم العزلات حساسة لمضادي الامبيبينيم والكلورامفينيكول، وتفاوتت نسبة المقاومة لباقي المضادات .

تم تحديد تحمل البكتريا لتراكيز مختلفة من المعادن الثقيلة وذلك بتنميتها على أوساط تحتوي على تراكيز مختلفة (٣ ، ١.٥ ، ٠.٣ ، ٠.٠٣) ملي مول من معادن (النحاس، الكوبلت، الزئبق، الفضة، والزنك) على التوالي حيث كان أعلى تركيز تحملته البكتريا لمعدن النحاس (٣) ملي مول، وأقل تركيز تحملته كان لمعدني الزئبق والفضة (٠.٠١) ملي مول.

تم إجراء عملية الأقران البكتيري Conjugation لمجموعة من العزلات التي أبدت مقاومة عالية للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة فضلاً عن إنتاجها لأنزيمات البيتا لاكتاميز مع السلالة القياسية *E.coli*MM294 ولم تستطع العزلات تحقيق الأقران في الوسط السائل والوسط الصلب ، بينما أستطاعت جميع العزلات الحاوية على بلازميدات والبالغة ١٨ عزلة تحقيق الأقران بنسبة ١٠٠% على الوسط الصلب

تم التحري عن المحتوى البلازميدي للخلايا الأقرانية ووجد أن اغلب البلازميدات كانت قد أنتقلت من السلالة الواهبة الى السلالة المستقبلة وقد أستطاعت ١٥ عزلة إقترانية (٨٣.٣%) من ١٨ عزلة إقترانية من إنتاج أنزيم البيتا لاكتاميز، وأستطاعت ٩ عزلات إقترانية (٥٠%) من إنتاج أنزيمات البيتا لاكتاميز الواسعة الطيف، وتمكنت 10 عزلات إقترانية (55.6%) من إنتاج أنزيمات البيتا لاكتاميز المعدنية، فضلاً عن ذلك قد أنتقلت مقاومة مشتركة لأكثر من مضاد حيوي ومعدن ثقيل للخلايا الاقترانية مما يدل على ان هذه الصفات محمولة بلازميدياً.

الكلمات الدالة: أنزيمات البيتا لاكتاميز، أنزيمات البيتا لاكتاميز الواسعة الطيف، الاقتران .

Possibility of transmission the character of antibiotics resistance and heavy metals by conjugation genetic process in *klebsiella pneumonia*

Received 7 January 2013 ; Accepted 27 January 2013

إمكانية إنتقال صفة مقاومة المضادات الحيوية والمعادن الثقيلة بعملية الإقتران الوراثي
 في بكتريا *Klebsiella pneumonia*
 د.عباس عبود فرحان الدليمي ، د.هادي رحمن رشيد الطائي، إيمان عباس علي الزنكنة

Abstract

The total 22 isolate of *K. pneumoniae* which isolated from different infected cases has been active through their growth on the Brain Heart Infusion Broth Media, and then the processes of detection for bacterial producing to the Beta lactamase was done.

19 isolate (86.4%) showed ability to produce β -Lactamase enzyme , also have the ability to produce the Extended spectrum β -Lactamase enzyme by using Disc Approximation , where was 9 isolates (40.9%), testing has been its ability to produce enzymes Metallo β -Lactamase and using the Imp-EDTA combination disc as managed 12 isolates (54.5%) production of the enzyme.

All isolates showed pattern of multiple drug resistance towards 16 anti biotics , as were all isolates (100%) were resistance to antibiotics Ampicillin , Carbencillin , and Pipracillin, while most of the isolates were sensitive to Imipenem and chloramphenicol, and varied resistance ratio for the rest of antibiotics.

Detection tolerate of bacteria to different concentrations of heavy metals and that their growing them on media containing different concentrations (3, 1.5, 0.03, 0.03 and 1.5) mmol. of metals (copper, cobalt, mercury, silver, and zinc) respectively where the highest concentration tolerance the bacteria to copper(3) mmol. , and the lowest concentration tolerance to metallic mercury and silver (0.01)

In the current study was conducted the bacterial conjugation for a group of bacterial isolates that have shown high resistance to antibiotics and heavy metals as well as the production of enzymes β -Lactamase with the standard strain E.coliMM294, and the Isolates were unable to achieve the conjugation in the liquid media or solid agar by Seldeen method, while 18 isolates which contain plasmids were able to achieve conjugation (100%) on solid agar by Miller method where depended on heavy growth and direct contact between the donor and recipient strains .

The current study found by investigation the plasmid profile for conjugated cells that the most of the plasmids had transferred from donor strain which represent by the isolates under study to standard strain , where 15 trans conjugated isolates (83.3%) from 18 isolate can produce β -Lactamase enzyme , while 9 trans conjugated isolate (50%) can produce extended spectrum β -Lactamase enzyme , and 10 trans conjugated isolate (55.6%) can produce Metallo β -Lactamase enzyme , in addition to the multi drug resistance and the heavy metal tolerance were transferred to the trans conjugated cells , a condition implying that they are plasmid mediated.

Key Words : *Klebsiella pneumoniae* , β -Lactamase , Metallo β -Lactamase , Conjugation

المقدمة

يعود جنس الكليبيسيلا إلى العائلة المعوية *Enterobacteriaceae* الذي يتميز بأنه سالب لصبغة كرام، يتراوح عرضها بين (0.3 – 1) مايكروميتر، أما طولها فيتراوح (0.6-6) مايكروميتر، وتمتاز هذه البكتيريا بأنها غير محللة للدم ولا تنتج غاز H₂S وأكثر أنواعها لها القدرة على أستهلاك اليوريا، وتكون مستعمراتها وردية اللون، مخاطية، ملساء على وسط الماكونكي الصلب، وتحتوي على المحفظة ومخمرة لسكريات اللاكتوز، الكلوكوز، السكروز، غير متحركة، لاهوائية اختيارية، عصوية الشكل، ومنتجة للحامض من الكلوكوز (Todar,2007 و Sharmeen et al.,2012).

(Talaro, 2002).

إمكانية انتقال صفة مقاومة المضادات الحيوية والمعادن الثقيلة بعملية الإقتران الوراثي في بكتريا *Klebsiella pneumonia*

د.عباس عبود فرحان الدليمي ، د.هادي رحمن رشيد الطائي، إيمان عباس علي الزنكنة

تمتاز هذه البكتريا بمقاومتها للمضادات الحيوية واسعة الطيف، إذ تستطيع مقاومة مضادات البيتا لاكتام عن طريق إنتاجها لأنزيمات البيتا لاكتاميز التي تعمل على تحطيم حلقة البيتا لاكتام وجعلها جزيئات غير فعالة حيويًا ومما يزيد في خطورة هذه الانزيمات حصول الطفرات في الجينات المسؤولة عن تشفيرها لتحويلها الى انزيمات واسعة الطيف مقاومة لمضادات البيتا لاكتام الحديثة ومنها الاجيال المتطورة للسيفالوسبورينات (Nass et al., 2003) (Keynamy and Rubinstlen, 2007).

بعد الإقتران البكتيري من أكثر الطرائق شيوعاً لانتقال بلازميدات المقاومة وعوامل الضراوة، وبصورة سريعة في المجاميع البكتيرية، ويحصل الإقتران بتكرار عال بين البكتريا من النوع نفسه، أو الأنواع القريبة مقارنة مع الأنواع الأخرى الأبعد وراثياً، وليس بالضرورة أن يحدث الإقتران في السلالات أو الأنواع القريبة فهو يحصل بين الخلايا المانحة والمستلمة من مختلف العوائل (Dionisio et al., 2002 و Ochman et al., 2000).

لذا جاء هذا البحث يهدف الى دراسة إمكانية انتقال صفة مقاومة المضادات الحيوية والمعادن الثقيلة بين بكتريا *E.coli* مع *K.pneumoniae*

المواد وطرق العمل :

1. نشطت 22 عزلة بكتيرية من إصابات مرضية مختلفة باستخدام وسط Brain heart infusion broth،
2. تم فحص الحساسية للمضادات الحيوية باستخدام طريقة (Bauer and Kerby) القياسية (Vandepitte et al., 1991) فُيست بعدها أقطار مناطق التثبيط حول كل قرص ، عُدت البكتريا حساسة أو مقاومة حسب المواصفات القياسية الواردة في (NCCLS, 2007) .
3. تم التحري عن قابلية البكتريا لإنتاج أنزيمات البيتا لاكتاميز باستخدام طريقة اليود القياسية السريعة حسب ما ورد في (WHO, 1978)
4. تم إختبار قابلية البكتريا على إنتاج أنزيمات البيتا لاكتاميز الواسعة الطيف باستخدام طريقة الأقراص المتاخمة (Jarlier et al., 1988)
5. تم التحري عن قابلية البكتريا لإنتاج أنزيمات البيتا لاكتاميز المعدنية باستخدام طريقة إتحاد المضاد الحيوي Imipenem مع EDTA (Bhalerao et al., 2010)
6. تم تحديد قابلية العزلات على تحمل 5 معادن ثقيلة شملت أملاح (النحاس ، الكوبلت ، الزنك ، الزئبق ، والفضة) ، حُضرت تراكيز مختلفة من أملاح هذه المعادن تراوحت بين 0.005 ملي مول الى 4.5 ملي مول لكل معدن وفق ما أشار إليه (Bhattacharjee et al., 1988)
7. تم التحري عن المحتوى البلازميدي للعزلات قيد الدراسة سيما تلك التي أظهرت مقاومة متعددة للمضادات الحيوية وعدد من أملاح المعادن الثقيلة وذلك باستخدام Pure Yield Plasmid Miniprep Kit الجهاز من قبل شركة Promega (U.S.A)، وبعد عزل الدنا البلازميدي وترحيل الدنا المستخلص على هلام الأكاروز أظهرت نتائج الدراسة الحالية أحتواء جميع العزلات قيد الدراسة على 2 حزمة من البلازميد تختلف في الحجم إذ أحتوت هذه العزلات على Mega Plasmid .
8. أجريت عملية الإقتران البكتيري في الوسط السائل بطريقة (O'Connell, 1984) وأجريت في الوسط الصلب بطريقتي (Seldeen, 1999) و (Miller, 1972) ، وأخضعت جميع الخلايا الإقترانية الى إجراء دراسة التحري عن أنزيمات البيتا لاكتاميز و أختبارات النقل المتزامن للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة .

النتائج والمناقشة

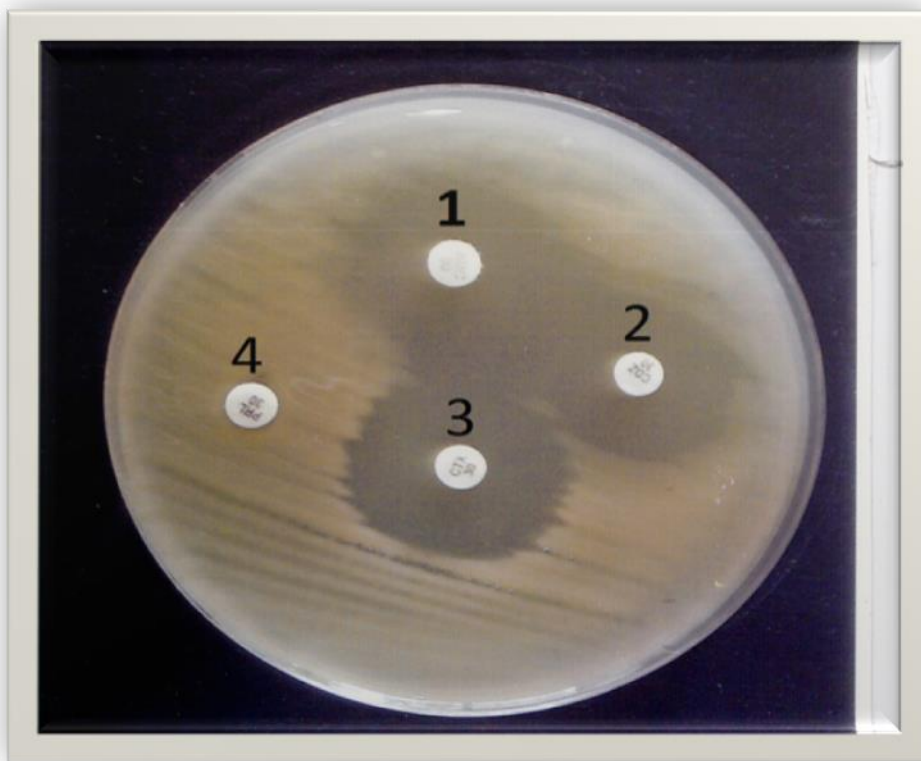
أظهرت نتائج هذه الدراسة أن (١٩) عزلة من مجموع (٢٢) عزلة من بكتريا *K.pneumoniae* أعطت النتيجة موجبة لإنتاج أنزيم البيتا لاكتاميز ونسبة (٨٦.٤%) (جدول-1)، وهناك أختلاف واضح في وقت إعطاء النتيجة الموجبة تراوح من عدة ثواني الى ٢ دقيقة، حيث يعمل أنزيم البيتا لاكتاميز بأختزال اليود الى ايودييد ويكون الأخير فاقداً لقابلية التفاعل مع النشأ وتكوين معقد بنفسي يتحول مباشرة، ويمكن تفسير هذا الأختلاف في الوقت على أساس تركيز أنزيم البيتا لاكتاميز المنتج في الفسحة البروتوبلازمية، فقد أشار الباحثان Perez and Hansson, 2002 الى أن إختزال اليود الى اليودييد يعتمد على تركيز أنزيم البنسلينيز المنتج في الفسحة البروتوبلازمية بالإضافة الى الحرارة والأس الهيدروجيني .

إمكانية إنتقال صفة مقاومة المضادات الحيوية والمعادن الثقيلة بعملية الإقتران الوراثي
في بكتريا *Klebsiella pneumonia*

د.عباس عبود فرحان الدليمي ، د.هادي رحمن رشيد الطائي، إيمان عباس علي الزنكنة

أظهرت نتائج هذه الدراسة أن عدد عزلات *K.pneumoniae* المنتجة للأنزيمات الواسعة الطيف كانت (٩) عزلات من مجموع (٢٢) عزلة وبنسبة (٤٠.٩%) (جدول-١) .

أكد الباحثان Sarojamma and Ramakrishna,2011 إن أنتشار السلالات البكتيرية المنتجة للأنزيمات الواسعة الطيف في أي مستشفى يعتمد على عوامل مختلفة منها طريقة أستعمال المضادات الحيوية، معدل النقل للسلالات المنتجة بين الأشخاص العاملين والراقدين في المستشفيات، نوع التعقيم المستخدم في وحدات المستشفى وخاصة في وحدات العناية المركزة .



شكل (١) : إنتاج أنزيمات البييتالاكتاميز واسعة الطيف للعزلة المحلية *K.pneumoniae*

١- مضاد الاموكساسلين / كلافيولنيك ٣- مضاد السيفوتاكسيم

٢- مضاد السيفتازديم ٤- مضاد البيراسلين

أظهرت نتائج هذه الدراسة إن ١٢ عزلة من عزلات البكتريا قيد الدراسة والبالغة (٢٢) عزلة قد أنتجت أنزيم الميتالوبييتالاكتاميز وبنسبة 54.5% (جدول - ١ ، شكل - ٢) ، هذا يعني أن هذا الأنزيم يجعل البكتريا مقاومة لمدى واسع من مضادات البييتالاكتام وذلك يجعل هذه المضادات غير فعالة وذلك بتحليل هذه المضادات (Wang et al.,2011) .

أشار الباحثون Deshmukh et al.,2011 إن الجينات التي تُشفّر لإنتاج هذا الأنزيم موجودة على أنتكروانات Class 1 وأحيانا Class 3 وأن هذه الانتكروانات الحاوية على المحفظة الجينية gene cassettes تمنح المقاومة لباقي المضادات الحيوية مثل Fluoroquinolones , Aminoglycosides , Co-trimoxazole .

إمكانية إنتقال صفة مقاومة المضادات الحيوية والمعادن الثقيلة بعملية الإقتران الوراثي
في بكتريا *Klebsiella pneumonia*
د.عباس عبود فرحان الدليمي ، د.هادي رحمن رشيد الطائي، إيمان عباس علي الزنكنة



شكل (٢): النتيجة الموجبة لإنتاج أنزيم الميتالو بيتالاکتاميڤ للعزلة المحلية *K.pneumoniae*

٢- Imipenem and EDTA

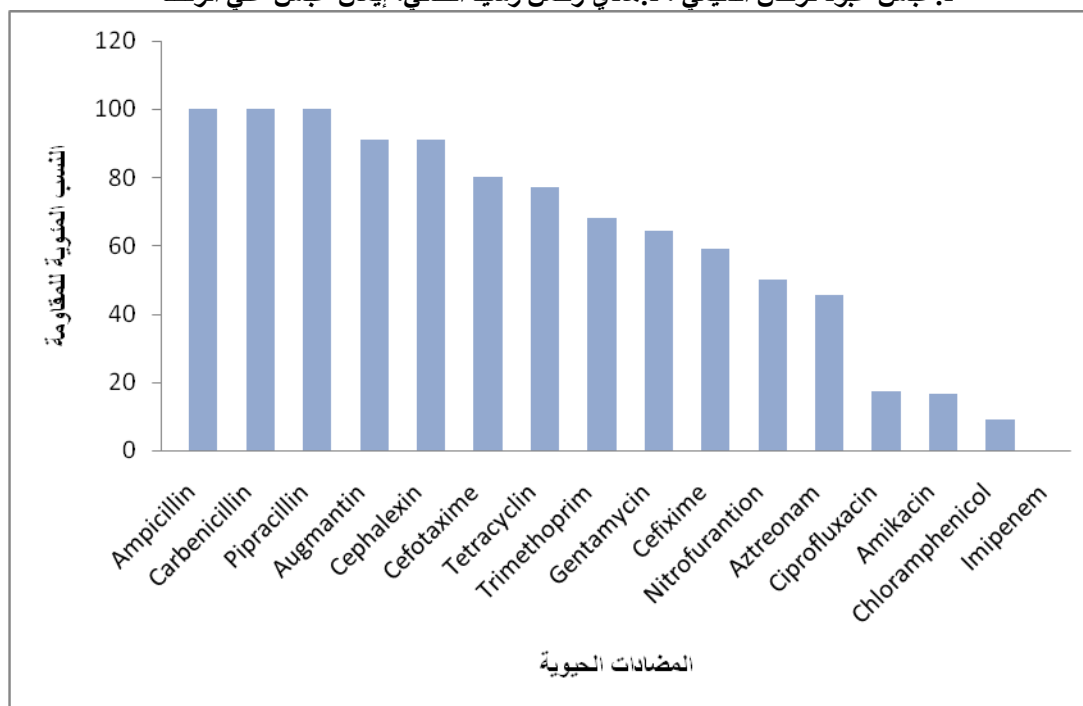
١- Imipenem

جدول (١) : النسب المئوية لعدد العزلات المنتجة لأنزيمات البيتا لاکتاميڤ

النسبة المئوية (%)	عدد العزلات المنتجة	الأنزيم
٨٦.٠%	١٩	البيتا لاکتاميڤ
٤٠.٩%	٩	البيتا لاکتاميڤ الواسعة الطيف
٥٤.٥%	١٢	البيتا لاکتاميڤ المعدنية

حددت مقاومة البكتريا اتجاه ١٦ مضادا من مضادات الحياة وقد أستعملت مجموعة من مضادات البيتا لاکتام ومضادات المجموعة الامينوكلابكوسيدية ومضادات الكوينولونات ، بالإضافة الى مضادات أخرى (شكل-٣) ، حيث كانت أعلى نسبة مقاومة لمضادات الامبسيلين والبيراسيلين والكاربنسيلين ونسبة ١٠٠ % ، وأقل مقاومة كانت لمضاد الاميبينيم بنسبة ٠ %

إمكانية إنتقال صفة مقاومة المضادات الحيوية والمعادن الثقيلة بعملية الإقتران الوراثي
في بكتريا *Klebsiella pneumonia*
د.عباس عبود فرحان الدليمي ، د.هادي رحمن رشيد الطائي، إيمان عباس علي الزنكنة



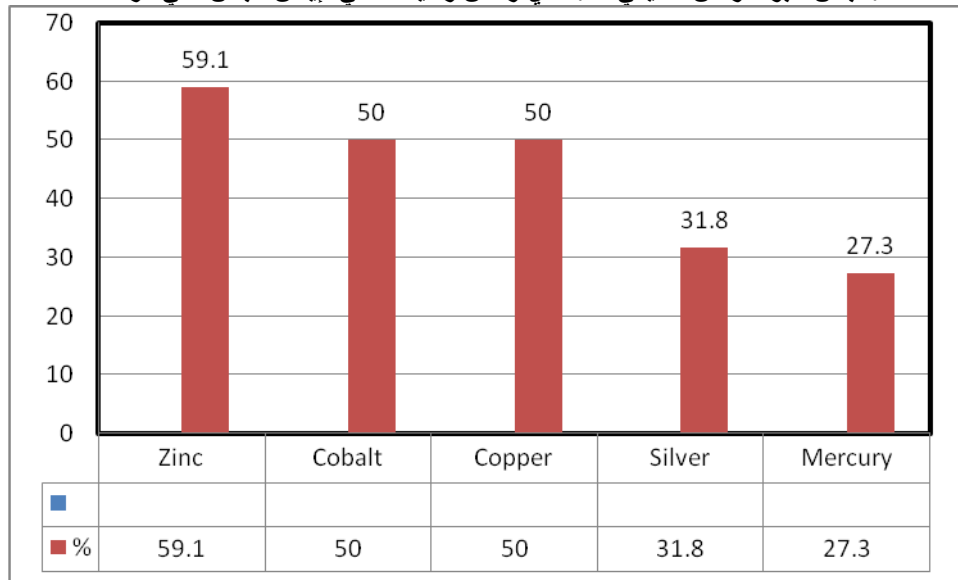
شكل (٣) : النسب المئوية لمقاومة بكتريا *K.pneumoniae* للمضادات الحيوية المختلفة

أن مقاومة بكتريا الفلورا الطبيعية في الامعاء جاءت نتيجة أكتسابها للبلازميدات ذات المقاومة المتعددة من البكتريا المجاورة لها في الامعاء عن طريق عمليات الاقتران البكتيري والتحويل الوراثي والتوصيل (Martinez- Martinez et al.,1998).

لقد أظهرت نتائج الدراسة الحالية مدى تحمل *K.pneumoniae* للمعادن الثقيلة (شكل ٤-٤)، قد استخدمت المعادن (الزنك، الزئبق، الفضة، النحاس، الكوبلت) وبتراكيز مختلفة. وكان أعلى تركيز تحملته البكتريا هو معدن النحاس (٣) ملي مول وبنسبة ٥٠%، بينما كان أقل تركيز تحملته البكتريا كان لمعدن الزئبق (0.01) ملي مول وبنسبة ٣٦.٤%.

إن مقاومة البكتريا للمعادن الثقيلة قد تكون نتيجة لوجود البلازميد الذي يتوسط مقاومة المعادن، وقد سجلت في بعض عزلات العائلة المعوية من الأصابات المكتسبة بلازميدات أقترانية تُشفر لمقاومة مختلف المعادن الثقيلة (Egbebi and Famurewa,2011).

إمكانية إنتقال صفة مقاومة المضادات الحيوية والمعادن الثقيلة بعملية الإقتران الوراثي
في بكتريا *Klebsiella pneumonia*
د.عباس عبود فرحان الدليمي ، د.هادي رحمن رشيد الطائي، إيمان عباس علي الزنكنة



شكل (٤) : النسب المئوية لمقاومة بكتريا *Klebsiella pneumonia* لمجموعة من المعادن الثقيلة

أُجريت عملية الإقتران البكتيري في الوسط السائل، وذلك للوقوف على الدور الذي تؤديه البلازميدات (خاصة الإقترانية منها) في إمكانية نقل صفة المقاومة للمضادات الحيوية والتحمل لعدد من املاح المعادن الثقيلة المستعملة، بالإضافة الى نقل صفة إنتاج أنزيم البيتا لاكتاميز وقد استخدمت طريقة التخافيف العُشرية ونميت العزلات على أوساط إنتقائية حاوية على معلمين Markers - 2 هما مضادي الريفاميسين والأمبسيلين، ولم تنجح العزلات قيد الدراسة في تحقيق عملية الإقتران، كررت هذه التجربة ثلاث مرات وعلى الرغم من ذلك لم يتم الحصول على مستعمرات مقترنة بالرغم من إحتواء العزلات على بلازميدات.

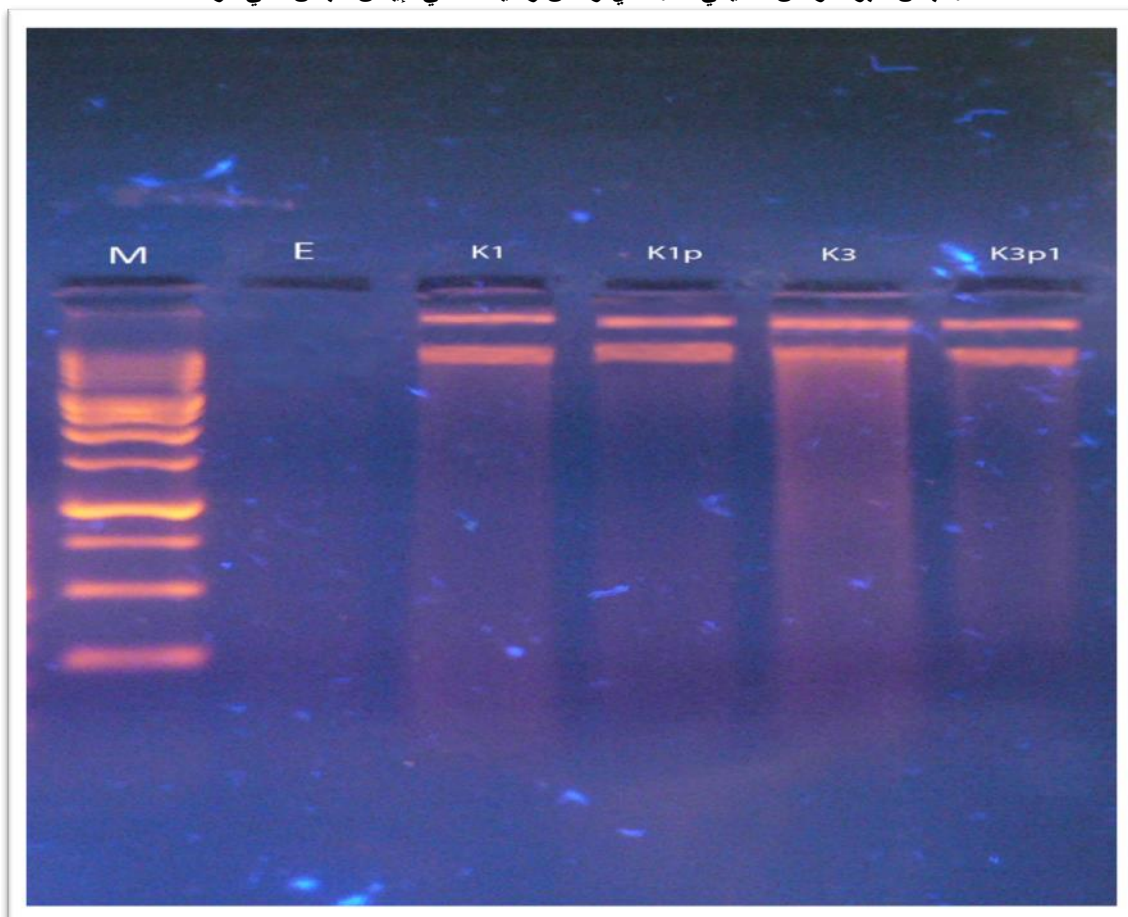
بعد أن فشلت العزلات قيد الدراسة في تحقيق الإقتران في الوسط السائل، تم تنمية العزلات على الوسط الصلب Trypticase Soya Agar بطريقة Seldeen,1999 لإجراء عملية الإقتران البكتيري والحصول على خلايا اقترانية، ونميت العزلات بعد ذلك على وسط إنتقائي يحوي مضادي الأمبسيلين والريفاميسين، ولم تنجح العزلات في تحقيق الإقتران وكررت هذه التجربة ثلاث مرات وعلى الرغم من ذلك لم يتم الحصول على خلايا اقترانية.

أُختبرت طريقة Miller,1972 بعد أن فشلت العزلات قيد الدراسة في تحقيق الإقتران بالطرق السالفة الذكر وتعتمد هذه الطريقة على التماس المباشر بين الخليتين الواهية والمستلمة، حيث تم نقل المستعمرات النامية من وسط نقيع القلب والدماغ الصلب مباشرة الى وسط يحتوي على مضادي الأمبسيلين والريفاميسين لمنع ظهور العزلات الواهية والسماح للعزلات المستلمة بالنمو إذا تمكنت من التعبير عن عامل المقاومة الذي جرى إنتخابه.

أظهرت نتائج الدراسة الحالية نجاح ١٨ عملية اقتران من أصل ١٨ عزلة وبنسبة ١٠٠% وكان هناك تشابهاً في نسق البلازميدات العائدة للخلايا الأصلية والاقترانية وقد أنتقلت جميع البلازميدات من الخلايا الأصلية للعزلات (Kpn46, Kpn112) الى الخلايا الاقترانية والواضح محتواها البلازميدي في (الشكل-٥). أشار Frifelder(1987) ان وجود البلازميدات المنقلة ذاتيا يسهل انتقال البلازميدات غير الاقترانية بشرط احتواء الاخيرة على الجينات المشفرة للانزيمات المتخصصة بعمل قطع في احد الشريطين، ويطلق على هذه العملية بالتحريك (Mobilization)، وهذا ما يفسر انتقال جميع البلازميدات الكبيرة منها والصغيرة من الخلايا الواهية الى الخلايا المستلمة.

عزى بعض الباحثين الى أن فشل تجارب الإقتران ربما يعود الى المواد المفردة من الخلايا المقترنة أو الى نوع الاهداب أو عوامل أخر مثل طبيعة وسط الإقتران، وربما تكون البلازميدات ذات طبيعة اقترانية لكنها فشلت بالإقتران بسبب قلة التماس بين الخلايا الواهية والمستلمة في الوسط السائل، وربما يكون السبب ايضا لقلة المواد من الخلايا المفردة أو ربما لقلة التماس بين الخلايا الواهية والمستلمة في التخافيف العشرية.

إمكانية إنتقال صفة مقاومة المضادات الحيوية والمعادن الثقيلة بعملية الإقتران الوراثي
في بكتريا *Klebsiella pneumonia*
د.عباس عبود فرحان الدليمي ، د.هادي رحمن رشيد الطائي، إيمان عباس علي الزنكنة



شكل (٥): المحتوى البلازميدي للخلايا الواهبة (*K. pneumoniae*) والمستلمة (*E. coli* MM294) (والخلايا المقترنة، تركيز الهلام 0.7%، 75 فولت / سم لمدة 90 دقيقة .

K1 : يمثل المحتوى البلازميدي للعزلة Kpn46

K1p : يمثل المحتوى البلازميدي للعزلة المقترنة Kpn46 مع السلالة القياسية

K3 : يمثل المحتوى البلازميدي للعزلة Kpn112

K3p : يمثل المحتوى البلازميدي للعزلة المقترنة Kpn112 مع السلالة القياسية

E : المحتوى البلازميدي للسلالة القياسية *E. coli* MM294

M : يمثل الدليل الحجمي (1000 bp) .

قد يُعزى سبب نجاح هذه الطريقة الى التماس المباشر بين الخليتين الواهبة والمستلمة حيث تمت هذه الطريقة بدون عمل أي تخافيف، حيث كان النمو كثيفاً مما أدى الى حصول الأقتران وبشكل ناجح، أو احتمال كون احدى نوعي البلازميدات في الخلايا الواهبة غير أقترانية ولكنها متحركة فانتقلت الى الخلايا الواهبة بوجود بلازميدات أقترانية في نفس الخلية بعملية تسمى Donation، أو قد تكون البلازميدات غير أقترانية وغير متحركة بنفس الوقت وهنا لاتستطيع الأنتقال إلا بوجود بلازميدات تتحد معها بعملية تدعى Conduction(المرجاني، ٢٠١١)

إمكانية إنتقال صفة مقاومة المضادات الحيوية والمعادن الثقيلة بعملية الإقتران الوراثي

في بكتريا *Klebsiella pneumonia*

د.عباس عبود فرحان الدليمي ، د.هادي رحمن رشيد الطائي، إيمان عباس علي الزكنة

تم التحري عن إنتقال صفة إنتاج أنزيم البيتا لآكتاميز في الخلايا الأقرانية وظهرت صفة إنتاج هذا الأنزيم في ١٥ عزلة من ١٨ عزلة إقترانية وبنسبة (٨٣.٣%) (جدول-٢).

جدول (٢) : إنتقال المحددات المسؤولة عن مقاومة المضادات الحيوية والمعادن الثقيلة وأنزيمات البيتا لآكتاميز عن طريق الأقران البكتيري

مظاهر المقاومة للخلايا المستلمة	مظاهر المقاومة للخلايا الواهبة	رقم العزلة
AMP.,Cb.,PRL.,Ce.,FT β Lac ⁻ , (Cu)	AMP.,Cb.,PRL.,Ce.,AMC.,TMP.,FT., (Cu,Ag), β Lac ⁻	Kpn7
AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,CFM.,A TM.,TE.,TMP β Lac ⁺ , (Zn)	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,CFM.,ATM.,C N.,TE.,FT.,TMP β Lac ⁺ , (Zn,Cu)	Kpn13
AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,ATM.,A MC.,TMP.,FT β Lac ⁻ , (Zn,Co)	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,ATM.,AMC.,C N.,TE.,TMP.,FT β Lac ⁺ , (Zn,Co)	Kpn16
AMP.,Cb.,PRL.,CFM.,CN β Lac ⁻ , (Zn,Co)	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,CFM.,CN.,TMP β Lac ⁺ , (Zn,Co)	Kpn17
AMP.,Cb.,PRL.,AMC.,CN,cl β Lac ⁺ , (Zn)	AMP.,Cb.,PRL.,Ce.,AMC.,CN,cl β Lac ⁺ , (Zn)	Kpn18
AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,ATM.,A MC. β Lac ⁻ , (Zn)	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,CFM.,ATM.,A MC.,TE β Lac ⁺ , (Zn)	Kpn26
AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,AMC., TMP β Lac ⁺ , (Co)	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,AMC.,TE., TMP β Lac ⁺ , (Co)	Kpn28
AMP.,Cb.,PRL.,CL.,CFM.,AMC β Lac ⁺ , (Cu)	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,CFM.,ATM.,CN., FT.,AMC β Lac ⁺ , (Cu,Ag,Hg)	Kpn29
AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,Cfm.,AT M.,AMC.,Cf.,C.,TE.,TMP.,FT β Lac ⁺ , (Zn,Cu,Ag,Hg)	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,Cfm.,ATM.,A MC.,AK.,CN.,Cf.,C.,TE.,TMP.,FT β Lac ⁺ , (Zn,Cu,Co,Ag,Hg)	Kpn46
AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,CFM., AMC., β Lac ⁺ , (Co)	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,CFM.,CN., AMC.,TE., β Lac ⁺ , (Co)	Kpn108
AMP.,Cb.,PRL.,CL.,AMC.,CN.,T MP β Lac ⁻ , (Zn)	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,ATM.,AMC.,C N.,Cf.,TE.,TMP β Lac ⁺ , (Zn)	Kpn111
AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,CFM.,A TM.,CN.,TE.,TMP.,AMC.,Cf β Lac ⁺ , (Co,Zn,Ag,Hg)	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,CFM.,ATM.,C N.,TE.,TMP.,AMC.,C.,Cf β Lac ⁺ , (Cu,Co,Zn,Ag,Hg)	Kpn112
AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,CFM.,A TM.,TMP.,AMC.,Cf. β Lac ⁺ , (Cu,Co,Zn)	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,CFM.,ATM.,C N.,TE.,TMP.,AMC.,FT.,Cf.,AK β Lac ⁺ , (Cu,Co,Zn,Ag,Hg)	Kpn114
AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,CN., FT β Lac ⁺ , (Cu,Co,Zn,Ag)	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,CN.,TE., TMP.,AMC.,FT.,Cf β Lac ⁺ , (Cu,Co,Zn,Ag,Hg)	Kpn117

إمكانية إنتقال صفة مقاومة المضادات الحيوية والمعادن الثقيلة بعملية الإقتران الوراثي
في بكتريا *Klebsiella pneumonia*
د.عباس عبود فرحان الدليمي ، د.هادي رحمن رشيد الطائي، إيمان عباس علي الزنكنة

AMP.,Cb.,PRL.,CL.,AMC.,TE., TMP.,ATM β Lac ⁺ , (Ag)	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,AMC.,TE., TMP.,FT.,ATM β Lac ⁺ , (Ag)	Kpn120
AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,Cfm.,A MC.,TE.,TMP β Lac ⁺ , (Zn,Cu)	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,Cfm.,ATM.,A MC.,AK.,CN.,Cf.,TE.,TMP.,FT β Lac ⁺ , (Zn,Cu)	Kpn126
AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,TMP β Lac ⁺ , (Zn,Cu)	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,AMC.,CN.,TE. ,TMP.,Cfm β Lac ⁺ , (Zn,Cu)	Kpn127
AMP.,Cb.,PRL.,Ce.,.,ATM.,AMC β Lac ⁺ , (Co,Zn)	AMP.,Cb.,PRL.,CL.,Ce.,.,ATM.,CN.,T MP.,AMC.,FT.,AK β Lac ⁺ , (Co,Zn,Hg)	Kpn128

وهذا يؤكد أن صفة إنتاج هذا الأنزيم محمولة بلازميدياً وتتفق مع ما أشار إليه الباحثون (Poirel et al., 2000) بأن أغلب أنزيمات البيتا لاكتاميز المكتشفة حديثاً تقع تحت سيطرة بلازميدات إقترانية كبيرة الحجم تُشفر للمقاومة المتعددة فضلاً عن مسؤوليتها لمقاومة المعادن الثقيلة. تم إجراء فحص التحري على أنزيمات البيتا لاكتاميز الواسعة الطيف، إذ أستطاعت ٩ عزلات وبنسبة ٥٠% من إنتاج هذا الأنزيم مما يشير الى أن صفة إنتاج هذا الأنزيم قد تكون بلازميدية أو قد تكون محمولة على الكروموسوم .

تم التحري عن إنتاج الخلايا الإقترانية لأنزيمات Metallo β -Lactamase إذ أستطاعت ١٠ عزلات وبنسبة ٥٥.٦% من إنتاج هذا الأنزيم مما يشير الى أن صفة إنتاج هذا الأنزيم قد تكون بلازميدية أو قد تكون محمولة على جينات كروموسومية.

أظهرت نتائج هذه الدراسة إنتقال صفة مقاومة أغلب المضادات الحيوية والمعادن الثقيلة من الخلايا الواهبة التي تملك صفة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة المستخدمة قيد الدراسة الى الخلايا المستلمة المتمثلة بالسلالة القياسية والحساسة لأغلب المضادات الحيوية عدا مضاد الريفامبين المقاومة له، (جدول-٣).

يلاحظ من الجدول (٣) إن أعلى نسبة إنتقال لمقاومة المضادات الحيوية كانت للأميسيلين، الكاربينسلين، والبيراسيلين بنسبة ١٠٠%، في حين كانت أقل نسبة مقاومة كانت للجنتاميسين وبنسبة ٣٥.٧%، وتتفق مع ما أشار إليه (Al-Charrakh et al., 2011) الى أن انتقال صفة مقاومة الجنتاميسين في الخلايا المقترنة لم يكن واضحاً وعزى سبب ذلك الى أن مقاومة هذا المضاد قد تكون كروموسومية الموقع، وكانت أعلى نسبة إنتقال للمعادن الثقيلة لمعدن الزنك حيث بلغت نسبة الإنتقال ١٠٠%، وأقل نسبة إنتقال كانت لمعدن الزنك وبنسبة ١٦.٦%. وتتفق مع ما أشار إليه (Rouch et al., 1995) الى ان بعض انواع المقاومة للمعادن الثقيلة مثل الزنك تكون محمولة على جينات كروموسومية.

لاحظ (Baron et al., 1999) ان الجينات المسؤولة عن مقاومة المعادن الثقيلة تكون محمولة على بلازميدات أو جينات قافزة، وأن هذه البلازميدات في بعض الحالات تحمل جينات مقاومة لبعض المضادات كالبينسيلين والكاربنسيلين والبيراسيلين والتي لها القدرة على الانتقال من خلية الى أخرى بواسطة الإقتران البكتيري (Conjugation) أو التنبيغ (Transduction).

إمكانية إنتقال صفة مقاومة المضادات الحيوية والمعادن الثقيلة بعملية الإقتران الوراثي

في بكتريا *Klebsiella pneumonia*

د.عباس عبود فرحان الدليمي ، د.هادي رحمن رشيد الطائي، إيمان عباس علي الزنكنة

جدول (٣) : يبين نسبة إنتقال المقاومة للمضادات الحياتية والمعادن الثقيلة خلال عملية الإقتران البكتيري

الصفة المظهرية لمقاومة المضادات البكتيرية والمعادن الثقيلة	عدد الخلايا الواهبة الحاملة للصفة	إنتقال الصفة الى الخلايا المستلمة	النسبة المئوية للانتقال
Ampicillin	١٨	١٨	%١٠٠
Carbencillin	١٨	١٨	%١٠٠
Piperacillin	١٨	١٨	%١٠٠
Cephalexin	١٨	١٧	%٩٤.٤
Cefotaxime	١٦	١٤	%٨٧.٥
Cefexime	١١	٩	%٨١.٢
Aztreonam	٩	٦	%٦٦.٧
Augmentin	١٦	١٣	%٨١.٣
Amikacin^١	٤	٠	٠
Gentamycin	١٤	٥	%٣٥.٧
Ciprofloxacin	٦	٣	%٥٠
Chloramphenicol	٢	١	%٥٠
Tetracyclin	١٣	٥	%٣٨.٥
Trimethoprim	١٤	١١	%٧٨.٦
Nitrofurantion	١٠	٥	%٥٠
Cobalt	١٠	٩	%٩٠
Copper	٨	٧	%87.5
Mercury	٦	١	%١٦.٧
Silver	٧	٥	%٧١.٤
Zinc	١٣	١٣	%١٠٠

الاستنتاجات

تدل هذه الدراسة على ان صفة مقاومة المضادات الحيوية والمعادن الثقيلة تنتقل بين أنواع بكتريا *K.pneumoniae* بطريقة الإقتران ، وهذا ما يشكل خطورة مرضية عالمية .

إمكانية إنتقال صفة مقاومة المضادات الحيوية والمعادن الثقيلة بعملية الإقتران الوراثي
 في بكتريا *Klebsiella pneumonia*
 د.عباس عبود فرحان الدليمي ، د.هادي رحمن رشيد الطائي، إيمان عباس علي الزنكنة
المصادر

*المرجاني، محمد فرج . (٢٠١١) . المضادات الحيوية المقاومة البكتيرية للمضادات الحيوية. عمان: دار دجلة .

- * Egbebi, A. O. and Famurewa, O. (2011) ; Heavy Metal Resistance among *Kelbsiella* Isolates in Some Parts of Southwest, Nigeria. *Asi .J.of Medical Sciences* 3(5): 183-185, 2011. ISSN: 2040-8773
- * Sharmeen, R. , Hossain, N. , Rahman, M. , Foysa, J. and Miah, F. (2012) ; *In-vitro* antibacterial activity of herbal aqueous extract against multi-drug resistant *Klebsiella* sp. isolated from human clinical samples . *International Current Pharmaceutical .J.*, 1(6): 133-137
- * Sharmeen, R. , Hossain, N. , Rahman, M. , Foysa, J. and Miah, F. (2012) ; *In-vitro* antibacterial activity of herbal aqueous extract against multi-drug resistant *Klebsiella* sp. isolated from human clinical samples . *International Current Pharmaceutical .J.*, 1(6): 133-137
- * Talaro,T.(2002).Foundations in Microbiology .4th .Ed. The McGraw-Hill Companies ,USA.
- * Talaro,T.(2002).Foundations in Microbiology .4th .Ed. The McGraw-Hill Companies ,USA.
- *Al-Charraikh , A. H. , Yousif S. Y.and Al-Janabi, H. S. (2011) ; Occurrence and detection of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella* isolates in Hilla, Iraq. *Afri. J. of Biotechnology* Vol. 10 (4), pp. 657-665.
- *Baron, E.J.; Peterson, L.R. & Finegold, S.(1999). Diagnostic Microbiology. 9th ed. Baily and Scott's. The C.V. Mosby company.
- *Bhalerao, D. S., Roushani, S., Kinikar, A. G. and Akhter, I. (2010) ; Study of Metallo-beta lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in Pravara Rural Hospital. *Pravara Med Rev* 2010; 5(3)
- *Bhattacharjee,J.W.; Pathak,S.P.; and Gaur,A.(1988) Antibiotic resistance & metal tolerance of coliform bacteria isolated from Gomati river water at Lucknow city. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 34: 391 – 399
1. *Deshmukh, D. G. , Damle, A. S. , Bajaj, J. K. , Bhakre, J. B. and Patwardhan, N. S. (2011) ; Metallo- β -lactamase-producing clinical isolates from patients of a tertiary care hospital. *J. of laboratory physicians*, Vol : 3 , Issue : 2 , Page : 93-97
- *Dionisio,F. ;Matic,L.; Radman,M.; Rodringuse,O.R. & Toddei,F. (2002).Plasmid spread very vast in heterogeneous bacterial communities .*Genetics*,162:1525-1532.
- *Frifeder,D.(1987) Molecular biology. 2nd ed. Yones and Barttett. Boston.
- *Jarlier, V.; Nicolas, M.; Fournier, G.; and Philippon, A. (1988). Extended broad-spectrum β -Lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: Hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis.* 10(4): 867-78.
- *Keynamy ,Y. and Rubinstein E. ,(2007).The changing face of *Klebsiella pneumoniae* infection in the community. *Int. J. Antimicrob.Agents*.30:385-389.
- *Martinez – Martinez, L.; Pascual, A.; and Jacoby, G.A.(1998) Quinolone resistance from a transferable plasmid. *The Lancet.* 351(4): 797 – 799.

إمكانية إنتقال صفة مقاومة المضادات الحيوية والمعادن الثقيلة بعملية الإقتران الوراثي
في بكتريا *Klebsiella pneumonia*

د.عباس عبود فرحان الدليمي ، د.هادي رحمن رشيد الطائي، إيمان عباس علي الزنكنة

- *Miller, J. H. (1972). Episome transfer: direct selection In: “ experiments in Molecular Genetics ”. Cold Spring Harbour Laboratory. New York. pp : 82 – 87.
- *Naas, T; Zerbih, M; Girlich, D.; Nordmann, P. (2003). Integration of Transposon Tn1-Encoded inhibitor resistant β -Lactamase Gene *bla*TEM-67 from *Proteus mirabilis*, into the *Escherichia coli* chromosome. *J. Antimicrob. Chemoth.* 47 (1): 19-20.
- *National Committee For Clinical Laboratory Standareds (2007) . Perfomance Standard For Antibiotic Susceptibility Testing NCCLS ; Seventeenth informational supplement . Vol. 27 No.1 M100-S17.
- *Ochman, H.J. ; Lawrence, J.G. and Groisman, E.A. (2000) . Lateral gene transfer and the nature of bacterial innoration. *Nature.*, 405: 299–304.
- *O'Connell,M.(1984). Genetic Transfer in prokaryotes transformation, transduction and conjugation.: 2 — 13 in *Advanced Molecular Genetic* by publisher, A. and Timmis. K. Springer verlug — Berlin.
- *Perez. F.J.: and Hanson, N.D.(2002) Detection of plasmid mediated AmpC β – Lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J. Clin Microbiol.* 40(6): 2153-2162.
- *Poirel, L.; Thomas, I.; Naas, T.; Karim, A.; and Nordmann, P.(2000) Biochemical sequence analysis of GES-1 a novel class A, extended – spectrum 13 – Lactamase, and the class 1 integron in 52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44(3): 622-632
- *Rouch, D.A.; Lee,B.T.O. ; and Morby, A.P. (1995) Understanding cellular responses to toxic agents: a model for mechanism choice in bacterial metal resistance. *J. Ind. Microbiol.* 14: 132 – 141.
- *Sarojamma, V. and Ramakrishna, V. (2011) ; Prevalence of ESBL-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Tertiary Care Hospital. *International Scholarly Research Network . ISRN Microbiology.*, Article ID 318348, 5 pages. doi:10.5402//318348
- *Seldeen,K.(1999): Transfer of genetic material between different general of bacteria.
- *Todar, K.(2007).The mechanism of bacterial Pathogenicity “*Klebsiella*”. *Todar's Textbook of bacteriology*.Wisconin-Madison Inc.USA.
- *Vandepitte, J.; Engback, K.; Piot, P. and Heuck, G. (1991). Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. WHO Switzerland.
- *Wang J-F, Chou K-C (2011) ; Insights from Modeling the 3D Structure of New Delhi Metallo-b-Lactamse and Its Binding Interactions with Antibiotic Drugs. *PLoS ONE* 6(4): e18414. doi:10.1371/journal.pone.0018414.Vol. 6 . Issue 4 . e18414.
- *WHO (1978) Techniques for the detection of β – Lactamase producing strains of *neisseria gonorrhoeae*. 616: 137 – 143.