Iraqi J. Biotech., Vol.6, No.1:31-41, 2007

دراسة دور حامض السالسيليك في تحييد بلازميدات المقاومة لنوعين من بكتريا الزحار

سهاد ناجي كلف

معهد الهندسة الوراثية والتقنية الاحيائية للدراسات العليا /
جامعة بغداد

استلم بتاريخ 2005/5/10 قبل بتاريخ 2006/1/5

الخلاصة

استخدمت الدراسة سلالتين من بكتريا الزحار (*Shigella dysenteriae,Sh. sonnei*) المعزولة من حالات الاسهال، أظهرت النتائج مقاومة العزلتين للمضادات التالية:
الأمبسلين ، السيفوتاكسيم ، الكاناماسين ، الستربتومايسين ، حامض النالدكس ، في حين تغايرت في مقاومتها للمضادين : التتراسايكلين والكلورامفينكول ، كذلك ظهر ان احدى السلالتين (*Sh.sonnei*) منتجة للبكتريوسين ، احتوت السلالتين على حزمة دنا بلازميدي كبيرة الحجم وعدد من الحزم الصغيرة كما ظهر ذلك من نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز للدنا المستخلص.
أظهرت نتائج الاقتران البكتيري مع سلالة مختبرية من اشريشيا القولون انتقال جينات المقاومة للمضادات التالية: التتراسايكلين والكلورامفينكول والستربتومايسين وحامض النالكس والامبسلين كذلك أمكن نقل صفة انتاج البكتريوسين مما يثبت تموضع هذه الصفات على بلازميد اقتراني اما صفة المقاومة للمضاد السفوتاكسيم فقد تم نقلها عن طريق التحول الوراثي فضلا عن انتقال المقاومة للمضادات: الامبسلين وحامض النالدكس والتتراسايكلين بهذه الآلية مما قد يشير الى وجود نسخة اخرى من جينات المقاومة لهذه المضادات على بلازميد غير اقتراني.
تمت دراسة تأثير حامض السالسيليك (150 مايكروغرام/مل) من ناحيتي النمو والتحييد , حيث أثبتت النتائج ان ليس هناك تأثير لهذا الحامض على النمو في حين أثبت تأثيره كعامل محيد لبلازميدات المقاومة لكلا النوعين من جنس الشكيلا.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

STUDY THE ROLE OF THE SALICYLIC ACID IN CURING OF RESISTANCE PLASMIDS IN TWO SPECIES OF *SHIGELLA*

Suhad Naji Kalaf
Genetic engineering & Biotechnology for Postgraduate studies/
University of Baghdad

Received 10/5/2005 **Accepted 5/1/2005**

ABSTRACT

Two strains of *Shigella (Sh.sonnei, Sh.dysenteriae)* were isolated from patients suffering from diarrhea. The strains were screened for their resistance to some antibiotics, and the screening results indicated that they were resistant to Ampicillin, Cefotaxime, Kanamycin, Streptomycin and Nalidixic acid. Resistance to: Tetracyclin and Chloramphenicol varied between the strains. One of the strains (*Sh.sonnei*) was found to have the ability to produce bacteriocin.

The two strains (*Sh.sonnei and Sh.dysenteriae*) contained large plasmid band and various small bands.

Results of conjugation experiments between the *Shigella* as a donor and the standard *E.coli* strain *(MM294)* as a recipient indicated the transfer of resistance of Tetracyclin , Streptomycin , Nalidixic acid and Ampicillin in addition to bacteriocin production , this may refer to their location on a conjugative plasmid. Resistance to Cefotaxime was not transferable by conjugation, but by transformation. Transformation also expressed resistance to Ampicillin , Nalidixic acid and Tetracyclin which may indicate the presence of another copy of resistance genes on a non-conjugative plasmid in *Shigella*.

The study utilized the salicylic acid (150mg/ml) effects on the growth and as a curing agent , the results showed there was no effect of this acid on the growth of *Shigella spp* , while the results found a curing effect on the resistance genes of both species of *Shigella*.

Keywords: Salicylic acid, curing, *shigella*.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

المقدمة

تعد بكتيريا الزحار (الشكيلا) أحد أجناس الأسرة المعوية ، حيث تكون عصوية مكورة (coccobacilli) ، سالبة لصبغة كرام وغير مكونة للأبواغ، هوائية ولا هوائية اختيارية ومخمرة لعدد من الكاربوهيدرات ومنتجة للحامض بدون غاز (2,1).

تقسم هذه البكتريا الى أربعة مجموعات اعتمادا على الاختلاف في الفحوصات الكيموحيوية (3) وهي: (*Sh.flexneri ,Sh.boydii,Sh.sonnei ,Shigella dysenteriae*)

تتشابه أفراد هذا الجنس من حيث القابلية في أحداث مرض الزحار البكتيري ولكن بنسب متفاوتة بسبب الاختلاف في الصفات المستضدية (1) حيث أن معظم هذه المجموعات تكون منتجة للمستضد الجسمي(K) (4) ويعد المستضد الجسمي O كأساس في تقسيم المجموعات أعلاه الى أنماط مصلية مختلفة (5).

تأتي أهمية دراسة مقاومة مضادات الحياة لمعرفة مدى انتشار تلك المقاومة ومحاولة السيطرة عليها من خلال إعطاء النوع والجرعة المناسبة لعلاج الإصابة حيث ظل مفهوم المقاومة المفردة سائداً لغاية الخمسينات من القرن عندما تم عزل سلالة من بكتيريا الزحار (*Shigella*) تمتلك صفة المقاومة لأكثر من مضاد واحد ، لاحقاً أثبتت الدراسات ان صفة المقاومة المتعددة يمكن ان تنتقل كوحدة واحدة الى خلايا اخرى عن طريق الأقتران حيث تكون محمولة على عناصر خارج الكروسوم تسمى بلازميدات المقاومة (R-plasmid) (6) وتعد هذه البلازميدات من المؤشرات الجزيئية المهمة في الدراسات الوبائية الحديثة (7). ولاهمية البلازميدات في نقل وانتشار المقاومة لمختلف انواع المضادات, كانت هذه العناصر الوراثية محورا لعدد من البحوث التي تتناول تحييد صفات المقاومة المحمولة عليها ومنها استعمال حامض السالسيليك (الاسبرين) (8).

طريقة العمل

أ. العزل والتشخيص :

جمعت عينات الخروج من المراجعين لمستشفى اليرموك التعليمي في مدينة بغداد، ثم زرعت على الوسط الأغنائي السائل وعلى وسط الشكيلا- السالمونيلا الصلب ووسط ماكونكي ، حيث تم دراسة شكل المستعمرات وشكل الخلايا بعد تصبيغها بصبغة كرام وأجريت الفحوصات الكيموحيوية باستخدام العدد التشخيصية (Api20E) وكذلك باستخدام المصول المضادة (Antisera) (9).

ب . اختبارات التوصيف :

1- اختبار حساسية البكتريا لمضادات الحيوية: تم أجراء هذا الاختبار لفحص حساسية العزلات تجاه (8) أنواع من مضادات الحيوية بأتباع طريقة الأقراص (10).

2- التحري عن انتاج البكترويوسين: تم عمل هذا الاختبار بأتباع طريقة Shannon & Abbot والمطورة من قبل Graham (11).

ج. التجارب الوراثية:

1- عزل الدنا البلازميدي: تم إجراء العزل لبلازميدات العزلات قيد الدراسة باتباع طريق الترسيب بالملح (Salting out) (12).

2- التحول الوراثي: تم إجراء تجارب التحول الوراثي للعزلات قيد الدراسة باتباع طريقة Sambrook وجماعته (13).

3- الاقتران البكتيري: أجريت تجارب الاقتران البكتيري بأتباع طريقة Oconell (14).

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

4- المعاملة بحامض السالسيليك: أجريت هذه التجربة باتباع طريقة السعيد 1997.

النتائج والمناقشة

اظهرت نتائج اختبارات التوصيف المذكورة سلفا وجود عزلتين تعودان الى بكتريا الزحار (الشكيلا) ثبتت عائدتهما الى النوعين (*Sh.sonnei* ,*Sh.dysenteriae*) فضلا عن عدد من الطفيليات المسببة لحالات الاسهال.

تم التحري عن مديات المقاومة لمجموعات من المضادات الحيوية جدول رقم (1) حيث يلاحظ ان السلالتين كانتا مقاومتان لمضادي الامبسيلين والسفوتاكسيم (بيتا لاكتام) مما يؤيد عدد من الدراسات السابقة (15) التي تشير الى انتشار انتاج انزيمات البيتا لاكتيميز بين البكتريا المرضية والذي قد يعزى الى الموقع البلازميدي للجينات المشفرة لانتاج هذه الانزيمات وعليه سهولة انتقالها افقيا (16) ، وكما اوضحت بعض الدراسات امكانية حمل هذه الجينات على عناصر وراثية قافزة (transposons) تسهل حركتها من الكروموسوم الى البلازميدات الاقترانية مما يزيد من الخطورة الصحية لانتشار جينات المقاومة (14).

كذلك لوحظ ظهور مقاومة لمضادي Sm,Km وهما من مجموعة الامينوكلايكوسايدات والذي يعود الى حصول تحويرات في RNA (17) ، كذلك يلاحظ المقاومة لمضاد Nal والذي يعزى الى حدوث تحويرات في الانزيم DNA gyrase والذي يعمل عليه المضاد آنف الذكر، وغالبا ما تكون جينات المقاومة لهذا المضاد كروموسومية الموقع (18) ، يلاحظ من الجدول كذلك قابلية احدى السلالتين في انتاج البكتريوسين وهي (*Sh.sonnei*) وعدم قدرة السلالة الاخرى على انتاجه (*Sh.dysenteriae*) (19) حيث يعد البكتريوسين ذو اهمية في الدراسات الوبائية والمرضية وهو لا يعد عامل ضراوة مباشر وانما يكمن دوره في انتشار البكتريا وعليه يمكن تتبع البكتريا المنتجة فيما اذا كانت المصدر المسبب لبؤرة وبائية معينة.

جدول رقم (1): مديات المقاومة لمضادات الحياتية وإنتاج البكتريوسين في السلالتين قيد الدراسة (الشكيلا)

الأنواع البكترية	AP	CFX	Nal	Cm	Tc	Rif	Sm	Km	إنتاج البكتريوسين
Sh.dysenteriae	+	+	+	+	+	-	+	+	-
Sh.sonnei	+	+	+	-	-	-	+	+	+

\+ = مقاوم للمضاد / منتج للبكتروسين.
\- = حساس للمضاد / غير منتج للبكتروسين.
Nalidixic acid : Nal / Cefotaxime : CFX / Ampicillin : AP
Rifampicin : Rif / Tetracyclin : Tc / Chloramphenicol : Cm
Kanamycin : Km / Streptomycin : Sm

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

تمت دراسة المحتوى البلازميدي للعزلتين قيد الدراسة ايضا واظهرت النتائج احتواء العزلتين على حزمة بلازميدية كبيرة الحجم تكون هي المسؤولة عن ظهور عوامل الضراوة في جنس الشكيلا كذلك احتوائها على حزم بلازميدية صغيرة الحجم والتي بدورها قد تكون هي المسؤولة عن المقاومة لمضادات الحيوية (20) ، شكل رقم (1).

عند اجراء تجارب الاقتران حيث استخدمت العزلات قيد الدراسة كسلالات واهبة (donners) في حين استخدمت السلالة البكتيرية (*E.coli*) كسلالة مستلمة (recipint) وذلك لعدم احتوئها على بلازميد، واظهرت النتائج انتقال صفات المقاومة للمضادات التالية: Ap,Sm,Nal,Cm,Tc وكذلك انتقال صفة انتاج البكتريوسين مما يثبت تموضع هذه الصفات على بلازميدات اقترانية في حين لم تنقل صفة المقاومة للمضاد CFX الى العزلة المستلمة مما قد يشير الى تموضع جينات المقاومة لهذا المضاد على بلازميدات غير اقترانية او على الكروموسوم ، جدول رقم (2) وعند استخلاص الدنا من السلالتين المقترنتين لوحظ احتواء احدهما على حزمة بلازميدية كبيرة الحجم (*Sh.sonnei*) في حين احتواء الاخرى على حزمتين صغيرتين الحجم (*Sh. dysenteriae*) كما في الشكل رقم (1).

جدول رقم (2): أنتقال صفات المقاومة وصفة إنتاج البكتريوسين من جنس الشكيلا الى *E.coli MM294* بواسطة الاقتران

الأنواع البكترية	AP	F	CFX	F	Nal	Cm	Tc	Rif	Sm	Km	إنتاج البكتريوسين
SN.1	+	2.1×10^{-3}	-	-	+	+	+	+	+	+	-
SN.2	+	2.9×10^{-3}	-	-	+	-	-	+	+	+	+
E.coli MM294	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

SN.1: السلالة المقترنة مع السلالة *Sh.dysenteriae*

SN.2: السلالة المقترنة مع السلالة *Sh.sonnei*

\+ = مقاوم للمضاد / منتج للبكتروسين

\- = حساس للمضاد / غير منتج للبكتروسين

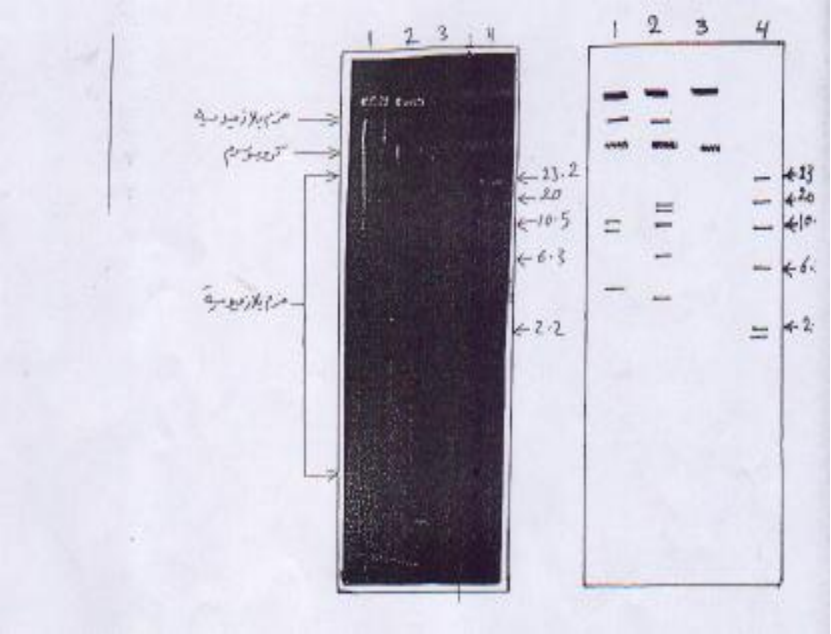
F (Frequency): تردد الاقتران ويمثل عدد البكتريا المقترنة في المليلتر/عدد الخلايا الواهبة في المليلتر.

Nalidixic acid: Nal / Cefotaxime : CFX / Ampicillin : AP

Rifampicin: Rif / Tetracyclin : Tc / Chloramphenicol : Cm

Kanamycin: Km / Streptomycin : Sm

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



شكل رقم (1): النسق البلازميدي لبكتريا الشكيلا وبكتريا اشيريشيا القولون باستخدام الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز 0.8 % وفرق جهد 70 فولت.

المسار الاول: المحتوى الوراثي للعزلة *Sh.dysenteriae*
المسار الثاني: المحتوى الوراثي للعزلة *Sh.sonnei*
المسار الثالث: المحتوى الوراثي للعزلة اشيريشيا القولون.
المسار الرابع: دنا العائي لامبدا (λ) مقطع بالانزيم Hind III كدليل حجمي (Kb).

وقد تم إجراء تجربة التحول الوراثي لتحديد موقع مورثات المقاومة والتي لم تنتقل الى السلالة المستلمة (*E.coli MM294*) في تجربة الأقتران فضلاً عن تأكيد هذه النتائج ، حيث تم أستخلاص الدنا البلازميدي من العزلات قيد الدراسة وتحويل هذه البلازميدات الى السلالة المستلمة (*E.coli MM294*) المؤهلة لالتقاط الدنا ، وقد أظهرت النتائج انتقال صفة المقاومة للمضاد CFX في كلا العزلتين مما يؤكد وجود هذا الجين على بلازميد غير اقتراني فضلاً عن أنتقال صفات المقاومة للمضادات: Ap, Nal, Tc كما في الجدول رقم (3).

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

جدول رقم(3): تحويل صفات المقاومة وصفة انتاج البكتريوسين الى بكتريا اشيريشيا القولون

السلالات المتحولة	AP	F	CFX	F	Nal	Cm	Tc	Rif	Sm	Km	إنتاج البكتريوسين
SN.3	+	2.9×10^{-2}	+	2.8×10^{-2}	+	-	+	+	-	-	-
SN.4	+	3.4×10^{-2}	+	2.1×10^{-2}	+	-	-	+	-	-	-

SN.3: السلالة المتحولة دنا السلالة *Sh.dysenteriae*

SN.4: السلالة المتحولة دنا السلالة *Sh.sonnei*

F (Frequency): تردد التحول ويمثل عدد الخلايا المتحولة / تركيز الدنا البلازميدي بالمايكوغرام/العدد الحي للخلايا المؤهلة.

Nalidixic acid : Nal / Cefotaxime : CFX / Ampicillin : AP

Rifampicin : Rif / Tetracyclin : Tc / Chloramphenicol : Cm

Kanamycin : Km / Streptomycin : Sm

وعند إجراء الاستخلاص للدنا المتحولة لوحظ أحتوائها على حزمة بلازميدية كبيرة الحجم ، كما في الشكل رقم (2).

تمت دراسة تأثير حامض السالسيليك في جنس الشكيلا حيث تمت زراعة كلا النوعين بوجود تراكيز مختلفة من الحامض 250,200,150,100 مايكروغرام / مليلتر حيث تم حساب العدد الحي للخلايا فظهر ان الحامض لا يؤثر على طبيعة نموها كما اوضحت بعض الدراسات ذلك (21). كذلك تم دراسة تاثير النمو المتكرر او الزرع المتكرر عند وجود تركيز 150 مايكروغرام / مليلتر من الحامض مما ادى الى فقدان صفات المقاومة بشكل كامل للمضادات Sm,Cm,Km,Tc,Nal,Ap فضلا عن فقدان صفة انتاج البكتريوسين في السلالة المنتجة (*Sh.sonnei*) ، في حين نمت بعض المستعمرات على الاوساط الحاوية على مضادات CFX,Ap ولتأكيد نتائج هذه التجربة تم اجراء استخلاص لدنا السلالة المحيدة لهذا الحامض ولوحظ عدم احتوائها على أي حزمة بلازميدية اما احتفاظ بعض المستعمرات لبعض الصفات فقد يعود الى وجود نسخة اخرى من جينات هذه الصفات على الكروموسوم وكما في الشكل (2) مما يتفق مع عدد من الدراسات السابقة (22,15).

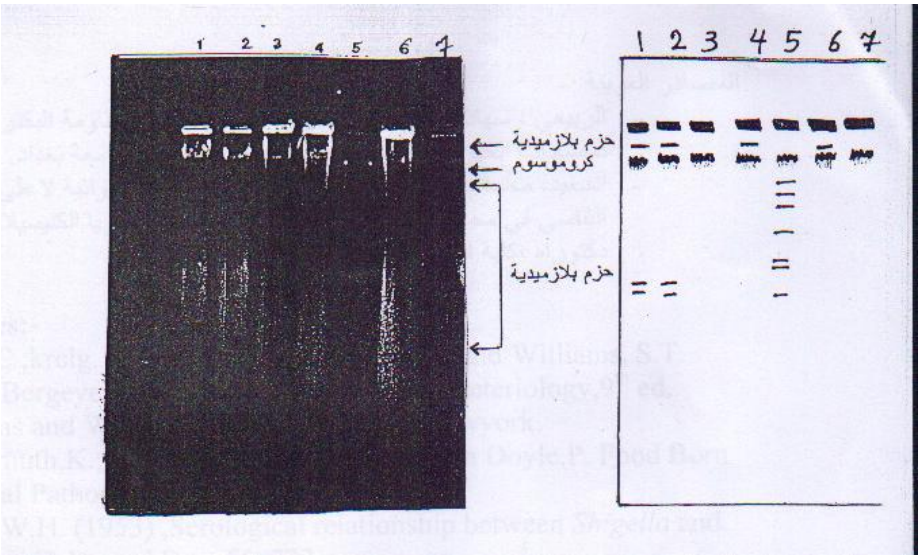
PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

جدول رقم(4): تحييد صفات المقومة وصفة انتاج البكتريوسين باستخدام حامض السالسيليك بتركيز 150(مايكروغرام/مليليتر)

إنتاج البكتريوسين	Km	Sm	Rif	Tc	Cm	Nal	%	CFX	%	AP	الأنواع البكتيرية
-	-	-	-	-	-	-	20	+	40	+	*Sh.dysenteriae*
-	-	-	-	-	-	-	30	+	45	+	*Sh.sonnei*

+ = مقاوم للمضاد / منتج للبكتروسين.
- = حساس للمضاد / غير منتج للبكتروسين.
Nalidixic acid : Nal / Cefotaxime : CFX / Ampicillin : AP
Rifampicin : Rif / Tetracyclin : Tc / Chloramphenicol : Cm
Kanamycin : Km / Streptomycin : Sm

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



شكل رقم (2): تحويل وانتقال الصفات المشفرة لمقاومة المضادات وانتاج البكتريوسين من الشكيلا الى اشيريشيا القولون. ويظهر الشكل الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز بتركيز (0.08%) وبفرق جهد (70) فولت ولمدة ثلاث ساعات.

المسار الاول: الدنا المستخلص من سلالة الشكيلا الواهبة (*SN.1*).
المسار الثاني: الدنا المستخلص من سلالة الشكيلا (*SN.2*).
المسار الثالث: دنا اشيريشيا القولون *E.coli MM294*
المسار الرابع: الدنا البلازميدي المتحول من السلالة (*SN.4*).
المسار الخامس: دنا العاثي لامبدا (λ) مقطع بالانزيم Hind III كدليل حجمي للاوزان الجزيئية.
المسار السادس: الدنا البلازميدي المتحول من السلالة (*SN.3*) الى اشيريشا القولون.
المسار السابع: الدنا المستخلص من السلالة المحيدة.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

المصادر

1. Holt, J.C.; Kreig, N.R.; Sneath, P.H.; Staly, J.T. and Williams, S.T. (1994). Bergeye Mannual of Determinative Bacteriology, 9th ed. Williams and Wiskins Publication. London, New York.
2. Wachsmuth, K. and Morris, G.K. (1989). *Shigella*. In Doyle,P. Food Born Bacterial Pathogens.
3. Ewing, W.H. (1953). Serological relationship between *Shigella* and Coliform Cultures. J. Bact. 66:333.
4. Freeman, B.A. (1985). Textbook of Medical Bacteriology.22th ed.W.B. Saunders Co. Philadelphia. London.
5. Frantzen, E. (1950). Biochemical and serological studies on alkalescens and dispar strains. Actopathol.Microb.Seawd. 27:236-248.
6. Hardy, K. (1989). Bacterial plasmids. Second edition, American Society of Microbiology.
7. Loybe, S.; Tsunode, M. and Mitsuhashi, S. (1994). Clonning and expression in Enterobacteraceae of the extended spectum β - lactamase gene from a *Pseudomonas aeuroginosa* plasmid. FEMS Microbiology letters.121:175-180.
8. السعيد، محمد صبري. (1997). الأصابات البكتيرية الهوائية لأعلى الجهاز التنفسي في محافظة بابل ودراسة النسق الوراثي للبكتريا الكلبسيلا، رسالة دكتوراه ،كلية العلوم ، جامعة بغداد.
9. Collins, C. and Lyne, P.(1987). Microbiology methods 5th ed. Bulteworths Co. (Publishers) Ltd.
10. Bauer, A.W.; Kirby, W.M.; Sheeis, J.C. and Turch, A. (1996). Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. American. J. Clin. Pathol. 45:493-496.
11. Abbot, J. and Graham, J. (1961). Colicins typing of *Shigella sonnei*. Mon. Bull. Minist; Hlth.Lab. Serv. 20: 51-58.
12. Posipiech and Neuman (1995). Saltin out procedure for the isolating of genomic DNA. Cited by Kieser, T. (1995). Norwich, U.K. (personal commun.).
13. Sambrook, J.; Fritagah, E. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbour laboratory. New York.
14. Oconell, M. (1984). Genetic transfer in prokaryotes; transformation, transduction and conjucation. In; Advanced Molecular Genetics. (eds A. pupler; k.Timmis) Pp:2-13. Spring Verlage, Berlin.
15. Poirel,L.; Nass,T.; Guiblri,M.; Chaibi,E.B.; Labia,R. and Nordmann,P. (1999). Molecular and Biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended spectrum β - lactamase encoded by *E.coli* integron gene. Antimicrobi. Agents. Chemother. 43(3): 573-581.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

16. Pechere, J.C. and Valdoianu, I.R. (1992). Development of resistance during ceftazidine and cefipime therapy in murine peritonitis Model. J. Antimicrob. Chemother.29: 563-573.

17. Henquell, C.; Chanel, C.; Sirot, D.; Labia,R. and Sirot, (1995). Molecular characterization of nine different types of mutants among 107 inhibitor-resistant TEMP β -lactamases from clinical is isolates of *E.coli*. Antimicrob. Agents. Chemother. 93:424-430.

18. Al-Zaag, A. and Pemberton, J.M. (1986). Clonning of hemolysis from *C.frenndii* and its expression in Phylogenetically related bacteria. FEMS. Microbiol. Lett. 37-341.

19. Satish, M. (1984). Enterobacteriaceac. In. the short textbook of medical microbiology.2nd ed. Pp. 220-239. Jaypee Brother medical publishers. Daryagoni, New Delhi. India.

20. Wartanbe, H. and Timmis, K.N. (1984). A small plasmid in *Shigella dysenteriae* I. Spcefic one or more functions essential for O-antigen production and Bacterial. Infect. Immun.43-391-6.

21. Domenico, P.; Schwartz. and Cunha-B. (1989). Reduction of capsular polysaccharide production in *Klebsiella pneumoniae*_ by sodium salicylate.Infect. Immun. 57:3778-3782.

22. الربيعي، سهاد ناجي. (2000). دور البلازميدات في مقاومة البكتريا المعوية لمضادات الحيوية ، رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة بغداد.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com