



الجمهورية العربية السورية

جامعة حلب

كلية الصيدلة

تحري مورثات المقاومة للكينولونات عند الايشريكية الكولونية والكليبسيلا الرئوية  
والمعزولة من مشافي حلب الجامعية

رسالة قدمت لنيل درجة الماجستير في التشخيص المخبري

إعداد الطالب

عمر الهيب

1435هـ

2014 م



الجمهورية العربية السورية

جامعة حلب

كلية الصيدلة

تحري مورثات المقاومة للكينولونات عند الايشريكية الكولونية والكليبسيلا الرئوية  
والمعزولة من مشافي حلب الجامعية

رسالة قدمت لنيل درجة الماجستير في التشخيص المخبري

إعداد الطالب

عمر الهيب

بإشراف

ال دكتور محمد ياسر عجي

مدرس في قسم الكيمياء الحيوية

والأحياء الدقيقة

كلية الصيدلة – جامعة حلب

الدكتورة روعة الكيالي

مدرس في قسم الكيمياء الحيوية

والأحياء الدقيقة

كلية الصيدلة – جامعة حلب

## الجنة المناقشة والحكم

اسم الدكتور	المرتبة العلمية	الاختصاص	الجامعة	الصفة
نهاد يوسف	أستاذ	احياء دقيقة	حلب	رئيساً
روعة الكيالي	مدرس	كيمياء حيوية	حلب	عضواً/مشرفاً
عبير الرمو	مدرس	أحياء دقيقة صناعية	حلب	عضواً



من قدموا لي كل التشجيع لإنهاء ما بدأته

والداي

سندبي في هذه الحياة..

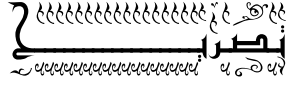
زوجهي

قدوتي في العمل والتحلي بالصبر في طلب العلم...

د. روعة الكيالتي - د. محمد ياسر محيي

إلى كل من مدوا لي يد المساعدة والعون...

أصدقائي وزملائي



أصرح بأن هذا البحث:

تجري مورثات المقاومة للكينولونات عند اللايكية قولونية والكليسييلة الرئوية والمعزولة من

مشافي حلب الجامعية

لم يسبق أن قدم لأي شهادة لا هو مقدم حالياً للحصول على شهادة أخرى

المرشح

عمر الهيب

*Declaration*

*It is hereby declared that this work has not already been  
accepted for any degree and it is not being submitted  
concurrently for any other degree*

CANDIDATE

*Omar Alheib*



نشهد أن العمل الموصوف في هذه الرسالة هو نتيجة بحث علمي قام به المرشح **عمر الهيب** تحت إشراف كل من **الدكتورة مروعة الكيالي** و**الدكتور محمد ياسر عبجي** المدرسين في قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة في كلية الصيدلة بجامعة حلب وان أتى مراجع اخرى ذكرت في هذا العمل موثقة في نص الرسالة وحسب ورودها في النص .

المشرف الرئيس	المشرف المشارك	المرشح
دمروعة الكيالي	د. محمد ياسر عبجي	عمر الهيب

حلب 2014

## Certificate

We witness that the described work in this treatise is the result of scientific search conducted by the candidate Omar Alheib under the supervision of Dr.Rawa Al-Kayali (main supervisor) teacher at the department of Biochemistry and Microbiology ,Faculty of Pharmacy,University of Aleppo, and Dr. M. Yaser Abajy (assistant supervisor) teacher at the department of Biochemistry and Microbiology ,Faculty of Pharmacy,University of Aleppo.

Any other references mentioned in this work are documented in the text of the treatise.

Candidate	assistant Supervisor	Main supervisor
Omar Alheib	Dr. M.Yaser Abajy	Dr. Rawaa Al-Kayali

Aleppo 2014

أجري هذا البحث في كلية الصيدلة في جامعة حلب، بإشراف الدكتورة روعة الكيالي، ومشاركة الدكتور محمد ياسر عبي و كلاهما بمرتبة مدرس في قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة في كلية الصيدلة في جامعة حلب

قدمت هذه الرسالة استكمالاً لمتطلبات نيل درجة الماجستير في التشخيص المخبري و نوقشت في تمام الساعة الثانية عشرة من يوم الاثنين الواقع في 2014/09/01م و أجزت.

أعضاء لجنة الحكم

الأستاذ الدكتور نهد يوسف، أستاذ في قسم الاحياء الدقيقة في كلية العلوم في جامعة حلب.

الدكتورة روعة الكيالي، مدرسة في قسم الاحياء الدقيقة في كلية الصيدلة في جامعة حلب (الأستاذ المشرف)

الدكتورة عبير الرموز، مدرسة في قسم الأحياء الدقيقة في كلية العلوم في جامعة حلب

## Index الفهرس

I	.....Index الفهرس
V	..... فهرس الأشكال
VII	..... فهرس الجداول
VIII	.....Abbreviations الاختصارات
IX	.....Abstract الملخص
1	.....Introduction المقدمة 1.
3	..... 1.1 الكينولونات والكينولونات المفلورة Quinolones & Flouroqionolones
5	..... 1.1.1 الآلية الجزيئية لعمل الكينولونات المفلورة
6	..... 2.1.1 أنزيمات الجيراز و التوبوايزوميراز Gyrase & Topoisomerase enzymes
9	..... 2.1 ظهور المقاومة
9	..... 1.2.1 آلية المقاومة الجرثومية للكينولونات-الأساس الوراثي للمقاومة
10	..... 1.1.2.1 المقاومة المرتبطة بالصبغي
10	..... 1.1.1.2.1 طفرات الأنزيمات المستهدفة من قبل الكينولونات
11	..... 2.1.1.2.1 تغيرات الغشاء الخلوي للحد من تراكم الدواء
11	..... 2.1.2.1 مورثات المقاومة للكينولونات المحمولة على البلازميد PMQR
12	..... 1.3.1 مورثات <i>qnr</i>
13	..... 1.1.3.1 منشأ وتوزع مورثات <i>qnr</i>
13	..... 2.1.3.1 بنية وآلية عمل بروتين الـ Qnr
14	..... 2.3.1 ناقلات أستيل أمينوغلوكوزيد، مورثة <i>aac-(6')-Ib-cr</i>



16	..... 3.3.1. المضخات النوعية الطارحة للكينولونات المفلورة
17	..... 4.1. التآزر بين آليات المقاومة للكينولونات
18	..... 5.1. البلازميد الحامل لمورثات PMQR
19	..... 6.1. الأهمية السريرية لمورثات PMQR
21	..... 2. الأبحاث السابقة
25	..... 3. أهمية البحث
25	..... 4. أهداف البحث
27	..... 5. مواد و طرائق البحث Materials and Methods
27	..... 1.5. دراسة حساسية العزلات الجرثومية تجاه السيبروفلوكساسين بطريقة التمديد
31	..... 2.5. دراسة مورثات المقاومة
31	..... 1.2.5. استخلاص الدنا الجرثومي
32	..... 1.1.2.5. استخلاص البلازميد Plasmid extraction
32	..... 2.1.2.5. استخلاص الجينوم Genome extraction
33	..... 3.1.2.5. التحقق من الدنا المستخلص Checking Eluted DNA
33	..... 2.2.5. تضخيم المورثات الهدف Amplification of target genes
36	..... 1.2.2.5. تفاعل البوليميراز السلسلي (PCR)
38	..... 1.1.2.2.5. البوادئ المستخدمة Used primers
39	..... 2.1.2.2.5. الكميات والتراكيز Amounts and concentrations
40	..... 3.1.2.2.5. شروط تفاعل الـ PCR

40	..... Gradient PCR المدروج	1.3.1.2.2.5
41	.....Agarose Gel electrophoresis	2.2.2.5
43	.....BtsCI عبر أنزيم الاقتطاع	3.2.5
44	.....Statistical analysis	3.5
45	.....Results	6
45	.....نتائج اختبار التحسس الجرثومي للسيبروفلوكساسين	1.6
47	.....(Genotype) (تحديد النمط الجيني للمقاومة)	2.6
47	..... <i>qnr</i> مورثات	1.2.6
50	..... <i>aac(6')-Ib-cr</i> ضمن مورثة <i>aac(6')-Ib</i>	2.2.6
52	.....دراسة العلاقة بين انتشار مورثات PMQR والمقاومة الظاهرية	3.6
53	.....توزيع العزلات الحاملة لمورثات PMQR ضمن قيم MIC المختلفة	4.6
54	.....التحري عن مورثات <i>qnr</i> ضمن الصبغي	5.6
55	.....Discussion	7
55	.....مقاومة الجراثيم للسيبروفلوكساسين من الناحية الظاهرية	1.7
56	.....انتشار مورثات PMQR	2.7
57	.....انتشار مورثات <i>qnr</i>	1.2.7
59	.....انتشار مورثات <i>qepA</i>	2.2.7
59	.....انتشار النمط الطافر <i>aac(6')-Ib-cr</i> variant	3.2.7
62	.....العلاقة بين النمط <i>aac(6')-Ib-cr</i> والمقاومة الظاهرية للسيبروفلوكساسين	3.7
62	.....العلاقة بين مورثات <i>qnr</i> والمقاومة الظاهرية للسيبروفلوكساسين	4.7

63	.....	5.7. التأثير التآزري لمورثات المقاومة.....
64	.....	1.8. الاستنتاجات.....
64	.....	2.8. التوصيات.....
65	.....	9. المراجع References.....
73	.....	10. الملحقات.....
73	.....	ملحق (1) مواصفات السلالات المرجعية لكل من الإشريكية القولونية والكلبيسيلا الرئوية.....
75	.....	ملحق (2) بروتوكول استخلاص الدنا البلازميدي.....
77	.....	ملحق (3) بروتوكول استخلاص الدنا الجينومي للجراثيم سلبية الغرام.....
80	.....	ملحق (4) عزلات الإشريكية القولونية.....
82	.....	ملحق (5) عزلات الكلبيسيلا الرئوية.....
84	.....	ملحق (6) تقارير تصنيع البواديء.....
85	.....	ملحق (7) النتائج الإحصائية.....
86	.....	ملحق (8) صور فوتوغرافية لأهم الأجهزة والأدوات المستخدمة.....
98	.....	Abstract.....

## فهرس الأشكال

- شكل (1) إنتاج حمض الناليديكسيك من الكلوروكين ..... 3
- شكل (2) الصيغة الكيميائية لحمض الناليديكسيك ..... 4
- شكل (3) الصيغ الكيميائية للكينولونات المفلورة الأكثر استخداماً في الممارسة السريرية ..... 5
- شكل (4) آلية عمل الكينولونات المفلورة ..... 6
- شكل (5) البنية الفراغية لأنزيم DNA gyrase ..... 7
- شكل (6) آلية عمل أنزيم الجهاز ..... 8
- شكل (7) دور أنزيم التوبوايزوميراز في فصل الصبغين خلال مرحلة الانقسام الخلوي ..... 8
- شكل (8) أسئلة نتروجين حلقة البيبرازينيل لمركب السيبروفلوكساسين ..... 15
- شكل (9) توضع مورث *qnrA* و مورثة *aac(6')-Ib* على نفس الانتغرون ..... 16
- شكل (10) البنية الثانوية لبروتين QepA ..... 17
- شكل (11) بنية الإنتغرون المحمول على بلازميد pMG252 والذي يحوي على مورثة *qnrA* ..... 19
- شكل (12) مورثة *qnrS* محاطة بـ تكرارات مقلوبة IR=inverted repeats ..... 19
- شكل (13) النسب المئوية لمقاومة الكينولونات المفلورة عند الإشركية القولونية (2009) ..... 21
- شكل (14) نسب المقاومة للكينولونات المفلورة عند الكليسييلة الرئوية (2009) ..... 22
- الشكل (15) عدد العزلات الجرثومية لكل من الكليسييلة الرئوية و الإشركية القولونية ..... 27
- شكل (16) الصفيحة Microtitration Plate الخاصة بلختبار حساسية العزلات الجرثومية بطريقة التمديد ..... 31
- شكل (17) تسلسلات التعرف لأنزيم الاقتطاع *BtsCI* ..... 43
- شكل (18) النسب المئوية للعزلات الجرثومية وقيم MIC الموافقة لها ..... 45

- شكل (19) نسب الحساسية والمقاومة للعزلات الجرثومية تجاه السيبروفلوكساسين ..... 46
- شكل (20) النسب المئوية لتحسس العزلات الجرثومية تجاه السيبروفلوكساسين ..... 46
- شكل (21) نتائج تضخيم مورثات PMQR ..... 47
- شكل (22) النسب المئوية لمورثات PMQR في دراستنا الحالية ..... 47
- شكل (23) النسب المئوية لتوزيع مورثة *qnr* ضمن النوعين المدروسين .. 48
- شكل (24) توزيع مورثات (*qnrS* ، *qnrB*) ضمن النوعين المدروسين ..... 49
- شكل (25) توزيع مورثات (*qnrS* ، *qnrB*، *qnrA*) ضمن العزلات الجرثومية..... 49
- شكل (26) تحديد النمط *aac(6')-Ib-cr* الطافر ..... 50
- شكل (27) النسب المئوية لتوزيع مورثة *aac(6')-Ib-cr* والنمط الطافر *aac(6')-Ib-cr* بين النوعين المدروسين.. 51
- شكل (28) النسبة المئوية لانتشار المورثتين *aac(6')-Ib-cr* و *qnr* ضمن النوعين المدروسين..... 51
- شكل (29) مقارنة النسب المئوية لمقاومة الجراثيم للسيبروفلوكساسين مع الدراسات العالمية..... 56
- شكل (30) النسب المئوية لمورثة *qnr* في دراسات مختلفة حول العالم ..... 57
- شكل (31) النسب المئوية لكل من مورثتي *qnrB* و *qnrS* في مناطق جغرافية مختلفة ..... 58
- شكل (32) النسب المئوية لتوزيع مورثة *qnrA* حول العالم ..... 59
- شكل (33) مقارنة النسب المئوية لانتشار النمط الطافر *aac(6')-Ib-cr* في دراسات مختلفة ..... 60
- شكل (34) مقارنة النسب المئوية *aac(6')-Ib-cr* | *aac(6')-Ib-cr* ..... 61
- شكل (35) النسب المئوية للعزلات الحاملة لمورثة PMQR ضمن المجال MIC (64-256) مكغ/مل.... 63

## فهرس الجداول

جدول (1) استبدال الحموض الأملنية عند حدوث طفرات في أنزيم ي الجيراز و التويوايزوميراز عند الإشركية القولونية.....	8
جدول (2) مكونات تفاعل الـ PCR .....	37
جدول (3) البواىء المستخدمة في تضخيم المورثات الهدف.....	39
جدول (4) كميات وتركيز المواد اللازمة لتفاعل الـ PCR .....	39
جدول (5) الشروط اللازمة لإجراء تفاعل الـ PCR .....	40
جدول (6) برنامج Gradient PCR لمورثتي <i>qepA</i> , <i>qnrA</i> .....	41
جدول (7) الحجم المستخدمة لإجراء تفاعل التهضيم.....	44
جدول (8) العزلات الجرثومية وقيم MIC الموافقة لها.....	45
جدول (9) النسب المئوية لتحسس العزلات الجرثومية تجاه السيبروفلوكساسين.....	46
جدول (10) توزع مورثات <i>qnr</i> ضمن العزلات الجرثومية.....	48
جدول (11) العزلات الجرثومية الحاملة لمورثات <i>aac(6')-lb</i> ، <i>aac(6')-lb-cr</i> .....	51
جدول (12) توزع مورثات المقاومة PMQR ضمن جميع العزلات الحساسة والمقاومة .....	52
جدول (13) قيم MIC للعزلات الحاملة لمورثة PMQR واحدة أو أكثر.....	53
جدول (14) توزع مورثات <i>qnr</i> على صبغيات 43 عزلة منتقاة عشوائياً .....	54

## Abbreviations الاختصارات

ATCC	American Type Culture Collection
bp	Base pair/base pairs
CFU	Colony forming unit
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
ddH <sub>2</sub> O	Distillate deionised water
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxynucleotide triphosphate
EtBr	Ethidium Bromide
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ESBL	Extended-spectrum- $\beta$ -lactamase
EUCAST	European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing
Fw	Forward
HGT	Horizontal Gene Transfer
IR	Inverted repeat
MIC	Minimum inhibitory concentration
NCCLS	National Committee For Clinical Laboratory Standards
ORF	Open reading frame
PCR	Polymerase chain reaction
PMQR	Plasmid Mediated Quinolone Resistance
QepA	quinolone efflux pump
Qnr	Quinolone Resistance
QRDR	Quinolone Resistance Determining Region
Rev	Reverse
TAE	Tris Acetate EDTA buffer
VGT	Vertical Gene Transfer

## الملخص Abstract

أخذت مقاومة الجراثيم للكينولونات المفلورة بالانتشار حول العالم ضمن عزلات سريرية من الأمعائيات، وتتضمن الآلية التقليدية للمقاومة ظهور عدة مورثات مسؤولة عن مقاومة الجراثيم للكينولونات ومحمولة على الصبغيات . ولكن تم مؤخراً اكتشاف مورثات مسؤولة عن مقاومة الكينولونات محمولة على البلازميد Plasmid PMQR Mediated Quinolone Rersistrance تؤدي إلى مقاومة منخفضة المستوى للكينولونات، قد يكون السبب في دفع الخلايا الجرثومية لزيادة تواتر حدوث الطفرات لتحقيق مستويات مقاومة عالية . لقد كان الهدف من الدراسة تسليط الضوء على مورثات PMQR ضمن عزلات جرثومية مأخوذة من مشافي حلب الجامعية، وتحديد دورها في حدوث المقاومة.

تم تحري المقاومة الجرثومية لصادات الكينولونات عند 123 عذلة من الأمعائيات المنتجة لأنزيمات Extended-spectrum-β-lactamase ESBL (99 إشريكية قولونية *Escherichia coli* و 24 كليبسيلا رئوية *Klebsiella pneumoniae*)، وتم تحديد المقاومة الظاهرية تجاه السيبروفلوكساسين بحساب التركيز المثبط الأدنى MIC بطريقة التمديد، كما تم التحري عن خمس مورثات مسؤولة عن صفة المقاومة لتلك الصادات وهي *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qepA* بالإضافة إلى *aac(6')-Ib-cr* وذلك باستخدام تقنية الـ Polymerase chain reaction PCR.

تبين لنا أن 103 عزلات تمتلك إحدى مورثات PMQR توزعت كالتالي (42 منها تمتلك مورثة *qnr* و93 منها تمتلك مورثة *aac(6')-Ib*)، كانت *aac(6')-Ib* الأكثر انتشاراً، أما مورثتي *qnrA* أو *qepA* فكانتا غير موجودتين عند جميع العزلات المدروسة، كما لاحظنا وجود علاقة ذات أهمية إحصائية تربط بين وجود مورثات *aac(6')-Ib-cr* والعزلات المقاومة للسيبروفلوكساسين من الناحية الظاهرية .

الكلمات المفتاحية: *PMQR*; *qnr*; *aac(6')-Ib-cr*; ESBL, *qepA* .



## 1. المقدمة Introduction

تزامن اكتشاف البنسلين (1940) مع التطور في الصناعة الدوائية وذلك في النصف الثاني من القرن العشرين مما أدى لاصطناع أجيال عديدة من الصادات الحيوية ساهمت بانخفاض ملحوظ في أعداد الوفيات حول العالم [1]. إلا أن الاستخدام المفرط (عدم الترشيد في استهلاك) للصادات الحيوية و عدم اتخاذ التدابير العلاجية المناسبة أدى لظهور سلالات مقاومة عبر الضغط الانتقائي selection pressure [2, 3]، وترافق ذلك مع زيادة أعداد الوفيات في ظل فقدان تلك الصادات الحيوية لفعاليتها [1].

ففي الآونة الأخيرة، أخذت مقاومة الجراثيم لكينولونات بالانتشار ضمن مجموعة الجراثيم سلبية الغرام Gram-negative bacteria [4]، وقد تم تفسير الأعداد المتزايدة من الأنواع الجرثومية المقاومة للكينولونات حول العالم إلى حدوث طفرات صبغية (الطريقة التقليدية لحدوث مقاومة للكينولونات)، إلا أن اكتشاف آليات حديثة للمقاومة تتضمن مورثات محمولة على البلازميدات وقابلة للانتقال أفقيًا horizontally يمكن أن تساهم في تفسير آليات حدوث تلك المقاومة [5].

“It is not difficult to make microbes resistant to penicillin in the laboratory by exposing them to concentrations not sufficient to kill them, and the same thing has occasionally happened in the body... and by exposing his microbes to non-lethal quantities of the drug makes them resistant”

(Fleming, Nobel Lecture 1945)

البيكساندر فلمنج (مكتشف البنسلين) يحذر من ظهور  
المقاومة منذ عام 1945

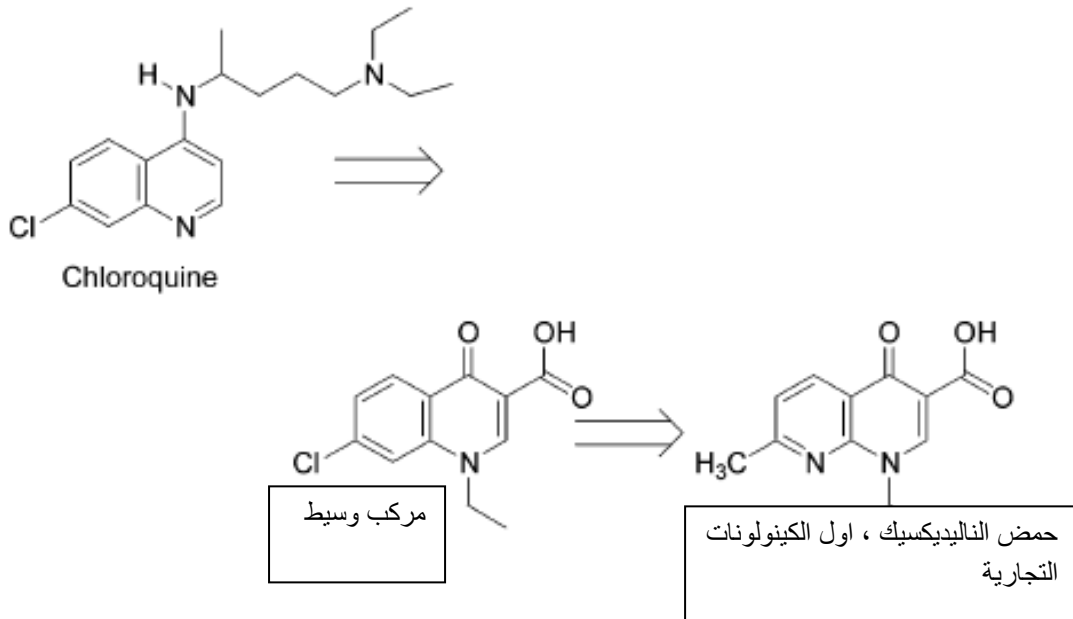
---

## القسم النظري

## 1.1 الكينولونات والكينولونات المفلورة Quinolones & Fluoroquinolones

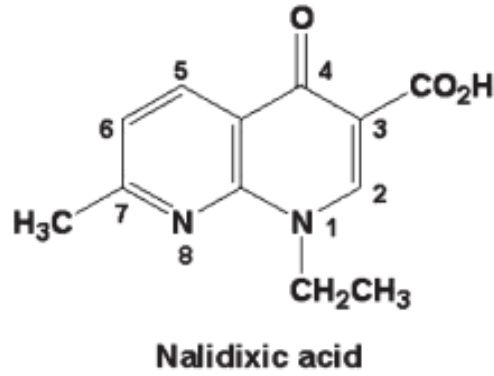
الكينولونات صادرات حيوية صناعية، قاتلة للجراثيم، أثبتت كفاءة اقتصادية وسريرية فهي فعالة فموياً ووردياً وتملك طيفاً واسعاً ضد الجراثيم، سهولة الاصطناع، كما تمتلك آلية تأثير جزيئية مختلفة عن باقي الصادات الحيوية، ولقد تطورت لتصبح من ضمن أكثر الأدوية الموصوفة في العالم [6, 7].

اكتشف حمض الناليديكسيك (Nalidixic acid) وهو أول صاد حيوي من زمرة الكينولونات في عام 1962 كنتاج ثانوي مرافق لاصطناع الكلوروكين المضادة للملاريا (شكل 1) والذي أظهر فعالية ضد الجراثيم سلبية الغرام، وبعد ذلك أصبح حمض الناليديكسيك متوفراً في السوق الدوائي وشكل الجي الأول للكينولونات، وعلى الرغم من أنه سهل التصنيع ويملك فعالية علاجية جيدة وتأثيراً قاتلاً للجراثيم سلبية الغرام، إلا أن طيفه المحدود فقط على الإشريكية القولونية وحرائكه الدوائية حدث كثيراً من استخدامه وخاصة في علاج الإنتانات البولية المكتسبة من المجتمع وقاد إلى تطوير مركبات الكينولونات المفلورة والتي تستخدم سريرياً بشكل واسع في وقتنا الحالي [8].



شكل (1) : إنتاج حمض الناليديكسيك من الكلوروكين

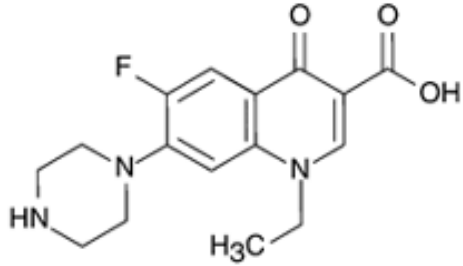
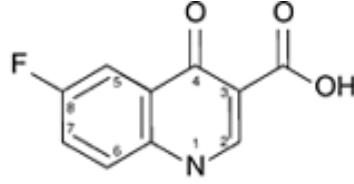
تمتعت الأجيال الأولى من الكينولونات كما في حمض الناليديكسيك nalidixic acid (شكل 2) بفعالية كبيرة ضد الجراثيم سلبية الغرام الهوائية دون أن تظهر فعالية واضحة ضد الجراثيم موجبة الغرام الهوائية أو حتى الجراثيم اللاهوائية. في حين أن الجيل الثاني من الكينولونات بما فيها الـ ofloxacin ، ciprofloxacin ، norfloxacin ، levofloxacin ، lomefloxacin ، pefloxacin كان له فعالية كبيرة ضد كل من الجراثيم الهوائية الموجبة والسلبية الغرام ولكنها أيضاً كانت ضعيفة ضد الجراثيم اللاهوائية [9].



شكل (2) : الصيغة الكيميائية لحمض الناليديكسيك

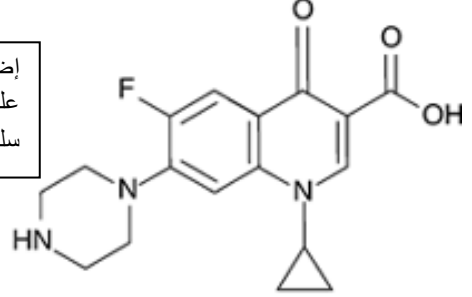
تم فيما بعد إضافة ذرة فلور على الموقع C-6 للمركب norfloxacin ما أدى للحصول على أول الفلوروكينولونات وقد كان ذلك الأساس لاصطناع مركبات الجيل الثالث من الكينولونات (grepafloxacin، gatifloxacin، sparfloxacin، tamefloxacin) والتي تميزت بفعالية كبيرة ضد الجراثيم موجبة الغرام وبشكل خاص المكورات الرئوية pneumococci و الجراثيم اللاهوائية، أما الجيل الأخير من مركبات الكينولونات (trovafloxacin، clinafloxacin، sitafloxacin، moxifloxacin، gemifloxacin) والذي يعتبر الجيل الرابع لمركبات الفلوروكينولونات، فقد تميز بفعالية كبيرة ضد الجراثيم اللاهوائية وتم تحسين فعاليته ضد المكورات الرئوية [8]. يبين (الشكل 3) الصيغة الكيميائية للكينولونات المفلورة الأكثر استخداماً في الممارسة السريرية.

البنية الرئيسية للكينولونات مع وجود ذرة فلور على كربون 6

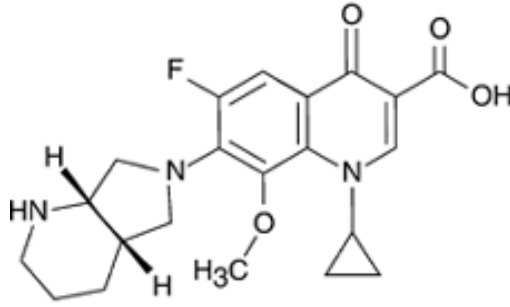


norfloxacin

إضافة حلقة بيبيرازينيل على كربون 7، فعال ضد سلبيات الغرام

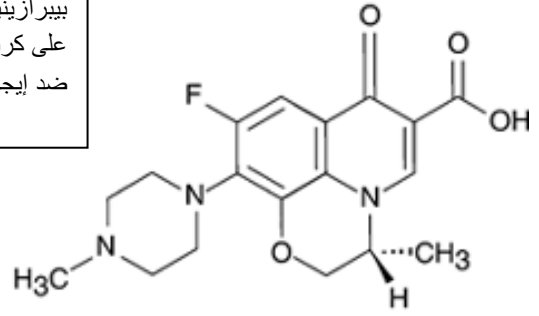


ciprofloxacin



moxifloxacin

إضافة حلقة بيبيرازينيل مستبدلة على كربون 7، فعال ضد إيجابيات الغرام

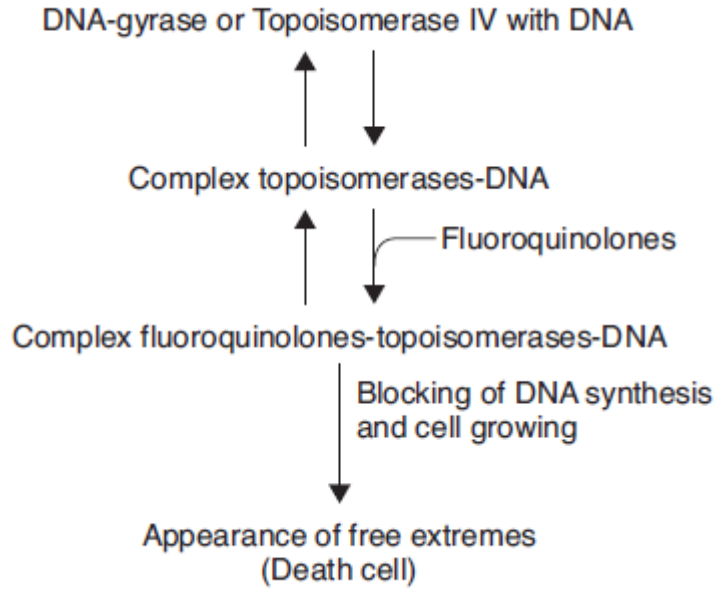


levofloxacin

شكل (3) : الصيغ الكيميائية للكينولونات المفلورة الأكثر استخداماً في الممارسة السريرية

### 1.1.1 الآلية الجزيئية لعمل الكينولونات المفلورة :

تستهدف الكينولونات المفلورة الأنزيمين الجرثوميين ( دنا جيراز و توبوايزوميراز VI ) الضروريين للنمو الخلوي والتكاثر [10]. حيث تقوم الكينولونات المفلورة بالعبور إلى داخل الخلية الجرثومية عبر قنوات غشائية مليئة بالماء (بورينات)، أو عن طريق اختراق الغشاء البلاسمي، وحالما تصل إلى داخل الخلية تقوم بتنشيط تضاعف الدنا الجرثومي بالتأثير على أنزيم الجيراز (توبوايزوميراز II) والتوبوايزوميراز IV [11, 12, 13]، حيث ترتبط جزيئات الكينولونات المفلورة مع معقد (أنزيم - دنا) مؤدية إلى تغيرات شكلية في الأنزيم يتبعه تشكيل معقد ثلاثي (كينولون - أنزيم - دنا) يهجع حركة شوكة التضاعف وأنزيم RNA polymerase وكذلك أنزيم الحلزنة helicase مما يؤدي إلى تنشيط تضاعف الدنا. وبترافق ما سبق مع ظهور نهايات حرة (سائبة) من جزيئات الدنا والتي يرتبط معها أنزيمات النطولياز الخارجية exonuclease وبالتالي تؤدي إلى موت الخلية [13, 14, 15] (شكل 4).

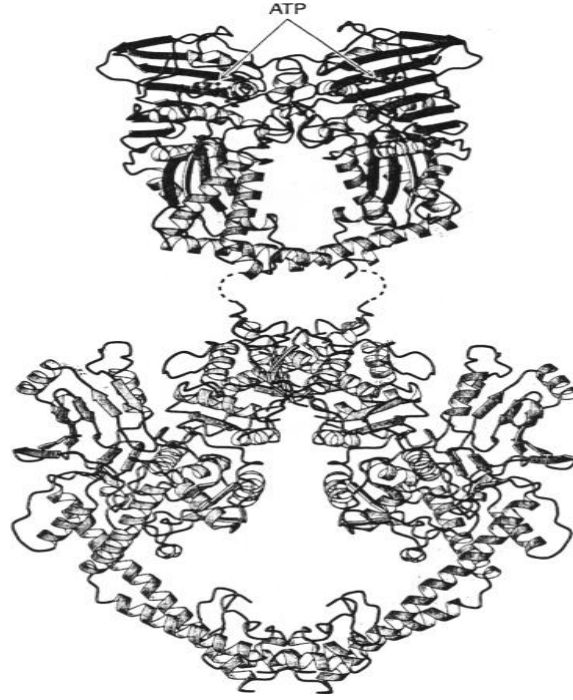


شكل(4) : آلية عمل الكينولونات المفلورة ( www.pnas.org )

### 2.1.1. أنزيمات الجيراز و التوبوايزوميراز Gyrase & Topoisomerase enzymes:

تحوي كل خلية جرثومية على صبغي يزيد طوله على أبعاد الخلية الجرثومية الواحدة ولا بد للجراثيم أن تتخطى هذه المشكلة الفراغية، لذا تلجأ عادةً إلى إنقاص طول صبغيتها عن طريق اللف الفائق السلبي المعاكس للالتفاف الحلزوني لشريط الدنا ويتم ماسبق عن طريق أنزيمات الجيراز و التوبوايزوميراز ، حيث تقوم بهذه الأنزيمات بعمل أثلام أو شقوق في شريط الدنا وإعادة وصلها من جديد بما يحقق اللف الفائق السلبي، وتعتبر العمليات السابقة ضرورية لتضاعف و تأشيب وإصلاح الدنا [16]

يتألف أنزيم الجيراز (توبوايزوميراز II) من تحت وحدتين *GyrA* وتحت وحدتين *GyrB*، تميز تحت الوحدات *GyrA* (97 kDa) بوساطة مورثة *gyrA* يبلغ طولها حوالي 620bp، وتمتلك نهايتين : الأولى أمينية N-terminal مسؤولة عن الانفصال وإعادة الارتباط، حيث تقوم بفك الروابط الفوسفو دي استيرية في جزيء الـ دنا وثبتت النهايات المقطوعة بروابط تشاركية ، والثانية كربوكسيلية C-terminal تمثل المكان الذي يلتف فيه الـ دنا حول الأنزيم [8]. يبين (الشكل 5) البنية الفراغية لانزيم DNAgyrase موضحة النهاية الامينية والتي هي منطقة ربط الـ ATP.

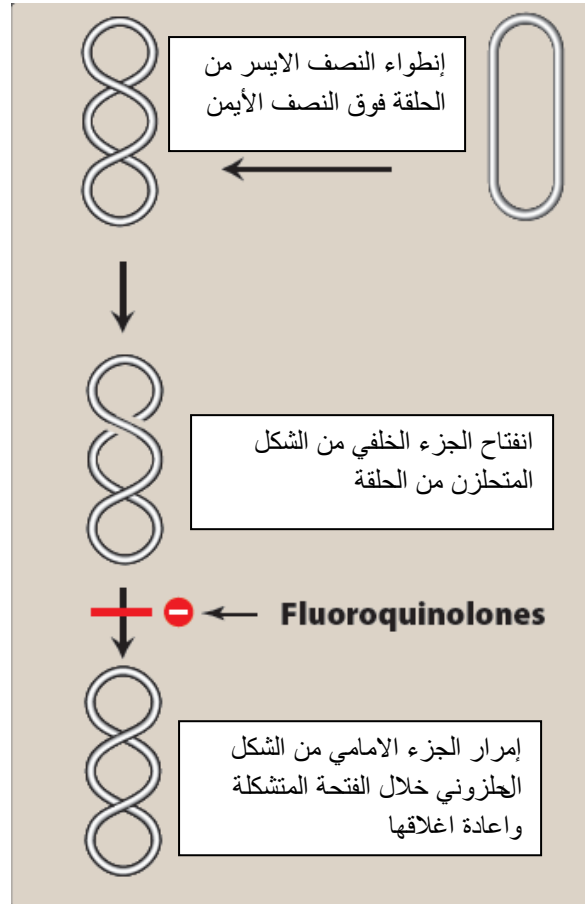


شكل (5): البنية الفراغية لأنزيم DNA gyrase

أما تحت الوحدات GyrB (90 kDa) فترمز بوساطة مورثة *gyrB*، تحوي على نهايات أمينية تساعد على ارتباط جزيئات الطاقة ATP التي توفر الطاقة اللازمة لإحداث تغييرات في التوضع الفراغي (topoisomeric change)، أما النهايات الكربوكسيلية فهي المسؤولة عن ارتباط الدنا والاتصال مع تحت الوحدات GyrA [8].

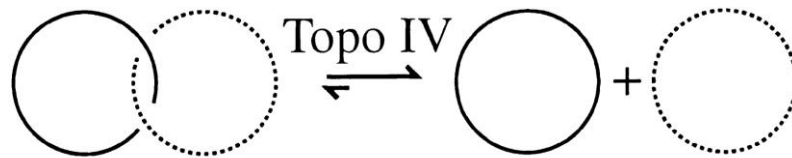
و يتكون أنزيم التوبوايزوميراز topoisomerase IV من تحت وحدتين ParC وتحت وحدتين ParE، يملك وظائف مشابهة لوظائف الجيراز بسبب التشابه في بنى تحت الوحدات لكل من أنزيمي الجيراز والتوبوايزوميراز حيث ترمز المورثة *parC* (559 bp) لتحت الوحدة ParC بينما ترمز المورثة *parE* لتحت الوحدة ParE [8].

تنظم الأنزيمات السابقة حدوث تغييرات فراغية topological في جزيء الدنا خلال النمو الخلوي بللية تتضمن قطع شريط الدنا (إحداث شق أو تلم)، إمرار شريط آخر عبر الشق، ومن ثم إعادة وصل النهايات الحرة مرة أخرى مع عدم التأثير على تتالي التسلسلات النكلوتيدية [8] شكل (6).



شكل(6) :آلية عمل أنزيم الجيراز (Lippincott's illustrated review: pharmacology)

\*قطع شريطي الدنا (الشريط الخلفي) ، مرور قطعة دنا غير مقطوعة ، من ثم إعادة التحام الشريطين المقطوعين (امام المستوي)  
يختلف أنزيمي الجيراز والتوبوايزوميراز IV في الوظيفة، حيث يعد الأول مسؤول عن حدوث اللف السلبي لجزيئات الدنا بهدف إنقاص التغيرات الفراغية الناتجة عن أنزيم الهليكاز helicase أثناء عملية التضاعف [17]، أما الثاني فهو مسؤول عن إنفصال الصبغيين المترابطين في المرحلة النهائية من الانقسام الخلوي شكل(7)، ويعد أنزيم الجيراز هو الهدف الرئيسي للكينولونات عند سلبيات الغرام ، في حين يعد التوبوايزوميراز IV هدفًا ثانويًا، ونجد عكس ذلك عند إيجابيات الغرام [7] .



شكل(7) : دور أنزيم التوبوايزوميراز في فصل الصبغيين خلال مرحلة الانقسام الخلوي



## 2.1. ظهور المقاومة

استخدمت الكينولونات المفلورة بنجاح ضد العديد من الإنتانات الجرثومية بدءاً من ثمانينيات القرن الماضي [18], [19]. وقد ساد الاعتقاد بصعوبة نشوء مورثات مقاومة للكينولونات، باعتبارها مركبات صناعية بشكل كامل. إلا أن المقاومة الجرثومية للكينولونات المفلورة أخذت بالانتشار حول العالم عبر الأمعائيات [4] بالتزامن مع الاستخدام المتزايد والعشوائي لتلك الكينولونات [2, 20, 21, 22].

ولقد سجلت مقاومة الجراثيم للكينولونات معدلات عالية حول العالم، بسبب استخدامها بشكل تجريبي أو وقائي [23]. ففي بلدان العالم الثالث بلغت المقاومة سويات مرتفعة مقارنة مع الدول المتقدمة بسبب الاستخدام المكثف للكينولونات نتيجة رخص ثمنها، أما في الدول المتقدمة فقد أر جعت الأبحاث ارتفاع معدلات المقاومة للكينولونات إلى شيوع استخدامها في الطب البيطري [8].

وقد لوحظ وجود معدلات عالية من المقاومة للكينولونات عند العديد من الأنواع الجرثومية في مناطق مختلفة من العالم. ففي الصين والتي تملك سويات مقاومة عالية، بلغت المقاومة للسيفوفلوكساسين بين العامين 1997-1999 أكثر من 50 % ضمن عزلات من الإشريكية القولونية [24] وفي دراسة صينية أخرى بلغت نسبة المقاومة للسيفوفلوكساسين 70% [25]. وفي الولايات المتحدة وحدها أدى زيادة استخدام الكينولونات المفلورة بمقدار 40 % إلى تضاعف معدل المقاومة للسيريفلوكساسين بين عصيات سلبية الغرام معزولة من وحدات العناية المركزة [26]، إضافة إلى تزايد المقاومة تجاه الكينولونات المفلورة في كل أنحاء أوروبا عموماً [27] لدرجة أنها لم تعد الخيار الأول في معالجة إنتان الطرق البولية منذ منتصف التسعينيات في إسبانيا على سبيل المثال [28].

### 1.2.1. آلية المقاومة للكينولونات-الاساس الوراثي للمقاومة

يمكن أن تنشأ المقاومة الجرثومية للكينولونات عن طفرات صبغية تتحكم بالتعبير عن قنوات البورين أو أ جهازة الضخ الخارجي والتي تقوم بدورها بالتحكم بمرور الصاد الحيوي من و إلى الخلية الجرثومية، من ناحية أخرى تتحقق المقاومة عن طريق إدخال (تأشيب) تسلسلات للمقاومة يقوم الينقول transposon بنقلها من موقع محدد على الدنا إلى موقع آخر ويتولى الإنتغرون التعبير الوراثي عنها ويعد هذه الأخير من العناصر الوراثية النقالة والتي تساهم بانتقال مورثات المقاومة، وتحمل المورثات السابقة على بلازميدات يتم تبادلها بين الأنواع الجرثومية المختلفة داخل جسم الإنسان أو الحيوان أو حتى في التربة [7].

### 1.1.2.1. المقاومة المرتبطة بالصبغي

تكتسب المقاومة المرتبطة بالصبغيات عبر طفرات تنتقل بشكل عمودي إلى الذري الأبناء progeny، والتي اعتُبرت لفترات طويلة السبيل الوحيد لتفسير مقاومة الكينولونات اعتماداً على دراسة أجريت عام 1987 على عزلات من الشيغيللا *Shigella dysenteriae* نفت وجود أي بلازميد قادر على نقل المقاومة للكينولونات [29].

تم تحديد آليتين لمقاومة الجراثيم للكينولونات تعملان بشكل منفصل عن بعضهما، وعندما تجتمعان مع بعضهما تؤدي إلى درجات متفاوتة من المقاومة تمتد من نقص الحساسية وصولاً إلى المقاومة السريرية [30]، [31].

الآلية الأولى: طفرات في أنزيمات الجيراز والتوبوايزوميراز تطرأ على الموقع الرابط للكينولونات أو ما يسمى المنطقة المحددة لمقاومة الكينولونات (QRDR) Quinolone Resistance Determining Region [32]، [33]، تؤدي إلى إحداث مستبدلات للحموض الأمينية مما يضعف من ارتباط الكينولونات بالأنزيمات الهدف [34]، [35]، [36].

الآلية الثانية: طفرات عشوائية تؤدي إلى تناقص تراكم الصاد الحيوي داخل الخلية الجرثومية عبر إنقاص نفوذية الغشاء الجرثومي تتجلى بإنقاص البورينات أو ظهور أنظمة ضخ فعالة تطرد جزيئات الدواء خارج الخلية [34]، [35].

#### 1.1.1.2.1. طفرات الأنزيمات المستهدفة من قبل الكينولونات :

تحدث المقاومة عند الجراثيم سلبية الغرام نتيجة طفرة نقطية تؤدي لاستبدال الحموض الأمينية في تحت الوحدات GyrA و GyrB المرزمة لتحت الوحدات من أنزيمات الجيراز، باعتبار أن الهدف الأساسي للكينولونات لدى الجراثيم سلبية الغرام هو أنزيم الجيراز ومن الممكن أن تحدث بنسبة أقل في مورثتي *parC*، *parE* اللتان ترمزان لتحت الوحدات من أنزيمات التوبوايزوميراز [8]، من ناحية أخرى فإن الطفرات في تحت الوحدة GyrA تكون أكثر تأثيراً من الطفرات في تحت الوحدة GyrB، وبشكل عام فإن الحصول على مقاومة هامة من الناحية السريرية يتطلب حدوث عدة طفرات على اعتبار أن سوية المقاومة تتناسب مع عدد الطفرات [2].

تحصل تلك الطفرات على وجه الخصوص في منطقة صغيرة ومحددة من المورثات السابقة تدعى QRDR، مما يقود إلى حدوث تغيرات في ثمالات residue الحموض الأمينية المتواجدة في الموقع الفعال الرابط

للكينولونات QRDR من تلك الأنزيمات جدول(1)، وهذه الطفرات من شأنها أن تزيد المقاومة للكينولونات عن طريق تغيير شكل موقع ارتباط الكينولونات مع هذا الجزء من الأنزيم [37].

جدول(1) : استبدال الحموض الامينية عند حدوث طفرات في كلا أنزيمي الجيراز و التوبوايزوميراز عند الإشرىكية القولونية

GyrA	GyrB	ParC	ParE
Ala51→Val Ala67→Ser Gly81→Cys, Asp Asp82→Gly Ser83→Leu, Trp, Ala, Val Ala84→Pro, Val Asp87→Ala, Asn, Gly, His, Tyr, Val Gln106→Arg, His	Asp426→Asn Lys447→Glu	Ser80→Arg, Ile, Leu Glu84→Gly, Lys, Val Gly78→Asp	Leu445→His

### 2.1.1.2.1. تغيرات الغشاء الخلوي للحد من تراكم الدواء :

يتم الحد من تراكم الدواء داخل الخلية من خلال زيادة التعبير عن المضخات الطارحة [33] أو عن طريق إنقاص التعبير عن بورينات الغشاء السيتوبلازمي الخارجي المسؤولة عن القبط المنفعل passive uptake للكينولونات المحبة للماء مما يؤدي إلى انخفاض ملحوظ في عدد الكينولونات التي تصل إلى الأنزيمات الهدف داخل الخلية [38].

لا يمكن للآليات السابقة أن تنتقل عبر عناصر وراثية نقالة، فقد أُجريت تجربة هدفت إلى إدخال المورثة الطافرة للجيراز والمحمولة على بلازميد صناعي إلى داخل الجراثيم الحساسة، ولكنها أدت فقط إلى زيادة ضئيلة في قيم التركيز المثبط الأدنى بسبب بقاء أنزيم الجيراز حساساً للكينولونات [39].

### 3.1. مورثات المقاومة للكينولونات المحمولة على البلازميد Plasmid Mediated Quinolone Resistance Genes (PMQR):

يمكن أن تنتقل المقاومة عن طريق مورثات طافرة محمولة على الصبغيات، أو عن طريق عناصر وراثية نقالة خارجية المنشأ مثل بلازميد R (Resistance) وما يحويه من إنتغروانات وينقولات مسؤولة عن المقاومة [40].

تم في عام 1998 اكتشاف بلازميد المقاومة للكينولونات pMG252 لأول مرة في أحد مشافي الولايات المتحدة ضمن عزلة كليبسيلا رئوية مقاومة للسيبروفلوكساسين، وبعد خمسة أشهر اكتشف نفس البلازميد ضمن عزلتين تابعتين لنوع الكليبسيلا الرئوية ونوع الإشرىكية القولونية واللذان تم عزلهما من مرضى مقيمين في نفس المشفى السابق مما يشير إلى إمكانية نقل ذلك البلازميد عبر الاقتران إلى عدة أنواع جرثومية أخرى [41]، وأمكن لذلك النوع من البلازميد أن ينتشر بشكل أفقي مما يفتح المجال أمام الإنتشار السريع للمقاومة بين الأنواع الجرثومية

المختلفة وقد أدت تلك الآلية المعتمدة على البلازميد إلى إنتشار المقاومة للكينولونات ولغيرها من الصادات الحيوية الأخرى مثل صادات البييتالاكتام، الامينوغلوكوزيدات، الماكروليدات والسلفاميدات [40, 42]

يوجد ثلاثة أنواع من المورثات المحمولة على البلازميدات والتي تسبب مقاومة للكينولونات (PMQR)

- مورثات *qnr* ترمز لبروتينات الـ *Qnr* وهي تقوم بحماية الأ نزيما ت (جيراز وتوبوايزوميراز) من تأثير الكينولونات ولها ثلاثة مم اثلات homologues (*qnrA* ، *qnrB* ، *qnrS*). [4].
- مورثات *aac-(6')-Ib* ترمز لأ نزيما ت ناقلة لزمرة الأ ستيل والتي بدورها تنقص من فعالية بعض الكينولونات [4]
- مورثات *qepA* ترمز لبروتينات الضخ الفعال الخارجي للكينولونات [43]

### 1.3.1. مورثات *qnr* quinolone resistance genes:

***qnrA***: اكتشفت عن طريق الصدفة خلال دراسة قام بها لويس وزملائه عام 1998 وتعد من أول المورثات التي ارتبطت بحدوث المقاومة للكينولونات عبر البلازميد، تمحورت الدراسة حول بلازميد يدعى PMG252 مأخوذ من سلالة متعددة المقاومة للكليبيسيلا الرئوية والمعزولة من عينة بول لأحد المرضى، كان الهدف من الدراسة تحديد مساهمة ذلك البلازميد في زيادة المقاومة لأحد صادات البييتالاكتام، وبشكل غير متوقع تم إكتشاف زيادة كبيرة في التركيز المثبط الأ صغري (MIC) للكينولونات، حيث أدى الهلازميد PMG252 إلى زيادة MIC للكينولونات بين 4 إلى 16 ضعفاً، وعلى الرغم من أن هذه الزيادة لم تصل إلى النقطة التي تمثل الحد الفاصل للمقاومة السريرية resistance breakpoint إلا أن هذا ال بلازميد مهد لحدوث درجة أعلى لمقاومة الكينولونات عبر التحريض على حدوث طفرات صبغية [41]، وقد أظهرت الدراسات اللاحقة أن المورثة المسؤولة عن النمط الظاهري السابق تتألف من 657 زوج أساس وقد دعي ت فيما بعد المورثة السابقة بـ *qnrA1* كما دعي البروتين التي ترمز له بـ QnrA1 [44]، وتم فيما بعد تحديد ستة أنماط variants من المورثة السابقة *qnrA1*، *qnrA2*، *qnrA6*....، تختلف عن بعضها بعدد من الكودونات (من 2-4 كودونات) [45].

***qnrS***: تم إكتشاف هذه المورثة عام 2003 من عزلة سريرية للشيجلا *Shigella flexneri* ضمن جائحة تسمم غذائي في اليابان [46]. دعي ت تلك المورثة *qnrS1* وتبين أنها ترمز لبروتين مؤلف من 218 حمض أميني والذي يشترك بـ 59% من حموضه الأ مينية مع QnrA1، كما اكتشف نوع ثاني من *qnrS* ودعي بـ *qnrS2* ضمن عزلات السالمونيلا *Salmonella enterica* في الولايات المتحدة [47]

**qnrB** : تم تحديد هذه المورثة في جنوب الهند ضمن سلالات كليبسيلا رئوية منخفضة المقاومة للكينولونات ولا تحوي مورثات *qnrA* وتبين أنها ترمز لبروتين 214 حمض أميني ودعيت فيما بعد *qnrB1*، كما تم تحدي سبعة عشر نوعاً لها *qnrB17...،qnrB1* [48].

### 1.1.3.1 منشأ وتوزع مورثات *qnr*

إن الانتشار الجغرافي الواسع لمورثات *qnr* عند الأنواع الجرثومية يعني بلن تلك المورثات في حالة إنتقال مستمر بين الأنواع الجرثومية المختلفة ومن الممكن أن يكون خفيًا *underdetected* في بعض الأحيان [4].

يعتقد بأن مورثات *qnr* نشأت وتكونت في صبغيات متعضيات مائية ، ثم أخذت بالانتقال عبر عناصر وراثية نقالة إلى كائنات أخرى. حيث قام العالم Poirel وزملاؤه [49] بدراسة تسلسلات صبغية لـ 48 نوع من الأحياء الدقيقة من أجناس متعددة ووجد *qnrA* في ثلاث سلالات من طحلب *Shewanella Algae* المنتشر في البحار والمياه العذبة مما يدعم الفرضية بأن صبغيات تلك الكائنات الحية تشكل مستودعاً لمورثات *qnrA*، كما تم اكتشاف بروتينات شبيهه بالـ Qnr من عزلات فصيلة الضمات *Vibrionaceae* المعزولة من الماء والتي يعتقد أيضاً أنها الأصل لبروتينات *QnrA*، *QnrB* و *QnrS*، وتتشابه بنية هذه الأخيرة مع بنية بروتينات Qnr بنسبة 40-67% مما يشير إلى أنها تعود لأصل واحد [41]. ومن ناحية المقاومة فتبين أنها تساهم بإنقاص سويات MIC للكينولونات من 4 إلى 8 أضعاف مقارنة مع قيمها عند نفس المتعضيات والتي لا تحوي على *qnr* محمولة على صبغيتها [49].

بعد اكتشاف مورثة *qnrA* في الولايات المتحدة، توالى الجهود للبحث عن هذه المورثة في مناطق جغرافية أخرى حول العالم، وتبين أنها منتشرة في كل من أوروبا، آسيا، أمريكا الشم الية، وإفريقيا [50]، [5]، كما تم إكتشافها عند العديد من الأ معائيات بما فيها الإ شريكية القولونية و الكليبسيلا *Klebsiella spp*، والسالمونيلا *Salmonella spp*، إضافة إلى إكتشاف *qnrA* مؤخراً عند الجراثيم الراكدة *Acinetobacter baumannii*، والتي لا تنتمي إلى الأمعائيات [51] وبنسبة أقل ضمن مجموعة جراثيم الزوائف والمنقلبات [50، 52، 53، 54].

### 2.1.3.1 بنية وآلية عمل بروتين الـ Qnr

من أهم صفات بروتينات Qnr هو حداتها، فقد اكتشفت بعد مرور ثلاثة عقود على الإستخدام السريري لأول دواء من زمرة الكينولونات (حمض الناليديكسك)، كما تم تحدي عدة مماثلات *homologues* من بروتينات Qnr ودعيت بـ *QnrA* و *QnrB* و *QnrS* وكلها متشابهة في بنيتها بنسبة 40-60% [4].

تتتمي هذه البروتينات إلى عائلة الببتيدات الخماسية المتكررة [55] pentapeptide repeats الضرورية لتشكيل صفائح بيتا [56] وتتألف من عدة وحدات متكررة من خمس حموض أمينية [57, 58]، والتي تحوي على تتاليات محفوظة من الحموض الأمينية التالية:

[Leu or Phe] [Gly] [Ser, Thr or Arg] [Asp or Asn] [Ser, Thr, Ala or Val] والتي غالباً ما تحتوي على الحمض الأميني لوسين أو فينيل الانين، وتقوم هذه البروتينات جميعها بحماية أنزيمات الـ DNA gyrase و topoisomerase IV من تأثير الكينولونات والفلوروكينولونات [4].

لا يؤثر بروتين Qnr على تراكم الكينولونات داخل الخلية ولا على فعاليتها وإنما يقلل من فرص تشكيل المعقد (كينولون - دنا - أنزيم) عبر التنافس مع الكينولون على الارتباط بالأنزيم الجيراز أو التوبوايزوميراز IV، مما يؤدي إلى إلغاء دور الكينولونات المثبط لحدوث الانقسام [59].

تعد مورثات *qnr* مسؤولة عن مقاومة الكينولونات والتي قد تكون منخفضة المستوى، إلا أن وجودها يساهم في توليد طفرات صبغية في الخلية الجرثومية عندما تتعرض للكينولونات بتر اكيز عالية [2]، حيث تؤدي إلى نشوء آليات إضافية لحدوث الطفرات تترافق مع مقاومة عالية وزيادة قيم MIC عدة أضعاف (من 0.25 إلى 8 مكغ/مل) [60].

تم تحديد مقدار المقاومة الناتج عن مورثة *qnrA* عن طريق قياس الفرق في الـ MIC للكينولونات عند سلالات الإشريكية القولونية الآخذة (المتقبلة) لبلازميد المقاومة (*E. coli* J53) قبل وبعد الإقتران (*E. coli* J53 transconjugant)، وتبين أن بروتينات Qnr تزيد التركيز المثبط الأصغري MIC للكينولونات عدة أضعاف [44]، فوجود المورثة *qnrA* يؤدي لزيادة الـ MIC للسيبروفلوكساسين من 12.5-250 ضعفاً [5]، أما المورثة *qnrS* تؤدي الـ MIC بين 16-62.5 ضعفاً [47]، في حين يؤدي وجود المورثة *qnrB* إلى زيادة التركيز السابق بين 8-62.5 ضعفاً [47, 48].

من الممكن أن تملك السلالات الجرثومية المانحة donor للبلازميد سوية للمقاومة أكبر من تلك المتقبلة للبلازميد عندما تملك آلية إضافية للمقاومة (طفرات صبغية في مورثات الـ *gyrA* و *parC* أو البورينات) بالتزامن مع وجود *qnr* [5].

### 2.3.1. ناقلات أستيل أمينوغلوكوزيد - أنزيم *aac-(6')-Ib-cr*

ترافق إكتشاف الصادات الحيوية الجديدة مع تطوير أنزيمات جرثومية مضادة لها والتي تقوم بتعديل بنيتها وبذلك تفقد فعاليتها، حيث تعد هذه الآلية الأكثر شيوعاً للمقاومة عند الجراثيم. وبما أن الكينولونات صادات صناعية

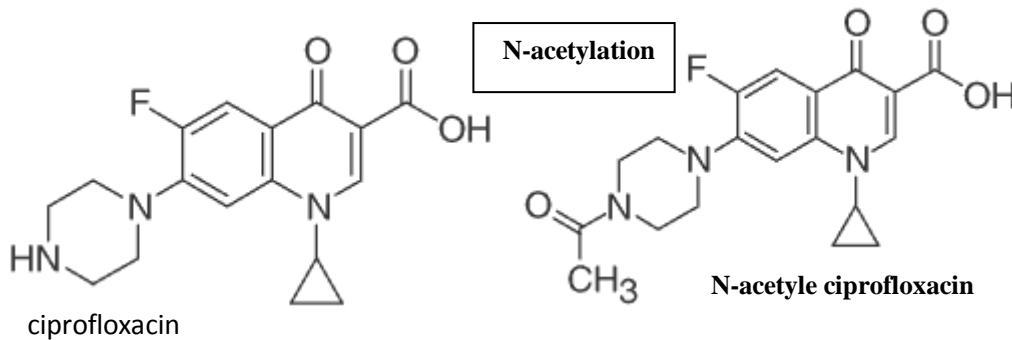
تصطنع في المختبر ولا تنتج عن طريق الجراثيم أو الفطور ف لا يوجد مقاومة طبيعية لها مما ساهم في تأخير إنتاج تلك الأنزيمات المعدلة لبنيتها [61].

تم في عام 2004 في كل من آسيا وأمريكا الشمالية تحديد الأنزيم الذي يملك القدرة على تعديل بنية الكينولونات، وتدعى المورثة المسؤولة عن إنتاج الأنزيم السابق *aac(6')-Ib-cr* وهي نمط *variant* من مورثات *aac(6')-Ib* [62].

ترمز مورثة *aac(6')-Ib* لأنزيم أمينوغليكوزيد أستيل ترانسفيراز *aminoglycoside acetyltransferase* وهو المسؤول عن مقاومة عدة أمينوغلوكونيدات (التوبراميسين والأميكاسين والكاناميسين) عبر تفاعلات الأستلة (نقل زمرة اسيتيل) مما ينقص فعاليتها، ولكن يمكن أن تتعرض المورثة السابقة إلى طفرة (Trp102Arg) أو (Asp179Tyr) لينتج لدينا نمط طافر يدعى *aac(6')-Ib-cr* قادر فقط على تثبيط السيبروفلوكساسين والنور فلوكساسين [61].

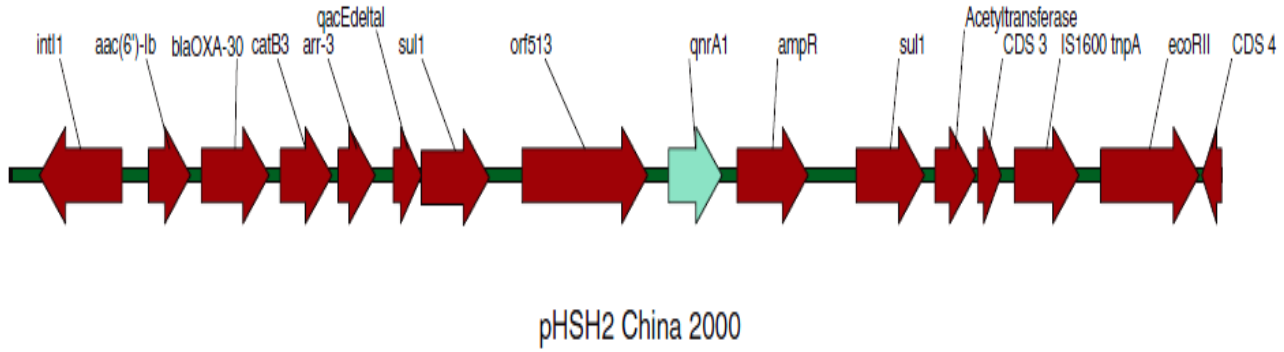
لقد اكتشفت مورثة *aac(6')-Ib-cr* في الفترة اللاحقة لإكتشاف مورثات *qnr* عندما لاحظ العلماء أن البلازميدات الحاملة لمورثات *qnr* تؤدي في معظمها إلى زيادة في قيمة MIC للسيبروفلوكساسين من 0.008 إلى 0.25 مكغ/مل، إلا أن بعض السلالات تؤدي لوصول MIC إلى 1 مكغ/مل مع نفي إمكانية حدوث فرط في التعبير عن مورثات *qnr*، وقد كان السبب انتقال مورثات مقاومة إضافية بلازميدية من نوع مختلف وهي مورثة *aac(6')-Ib-cr* [63].

يعمل الأنزيم عن طريق أستلة المركبات الحاوية على ذرة نيتروجين حرة (غير مستبدلة) من حلقة البيرازينيل والتي توجد فقط عند السيبروفلوكساسين والنورفلوكساسين [61] (شكل 8).



شكل (8) : أستلة نيتروجين حلقة البيرازينيل للسيبروفلوكساسين

يلعب هذا الأنزيم دوراً هاماً في مقاومة الجراثيم للكينولونات المفلورة، على اعتبار أن مورثة *aac(6')-Ib-cr* من أكثر مورثات PMQR انتشاراً وخصوصاً عند سلبيات الغرام [5]، إضافة إلى أن وجود هذه المورثة مع مورثات *qnr* محمولة على نفس البلازميد (شكل 9) يؤدي إلى تحقيق درجات مقاومة ذات أهمية سريرية [64]



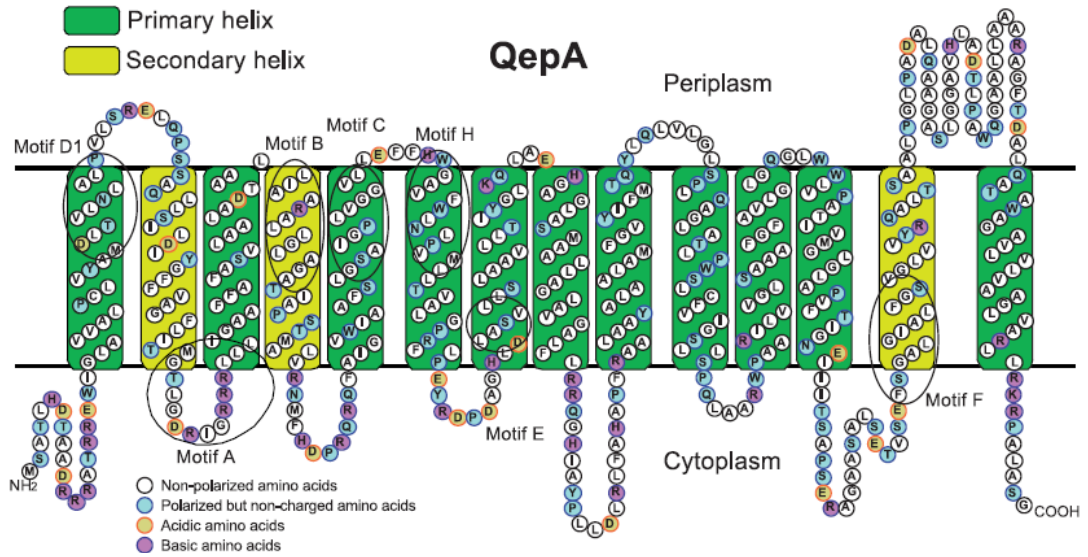
شكل (9) : توضع مورثه *qnrA* و مورثة *aac(6')-Ib* على نفس البلازميد

### 3.3.1. المضخات النوعية الطارحة للكينولونات المفلورة *qepA* quinolone efflux pump

اكتشفت هذه المورثة لأول مرة عام 2007 محمولة على بلازميد الإشريكية القولونية المعزولة من البول وكان ذلك في اليابان [43]، ثم اكتشفت فيما بعد في كل من كوريا الجنوبية [65]، وفرنسا [66] ولكن بنسب قليلة جداً لم تتجاوز 1%.

ترمز هذه المورثة لمضخة تطرح الصاد الحيوي خارج الخلية الجرثومية عن طريق الضخ الفعال مما يؤدي إلى زيادة المقاومة للكينولونات المحبة للماء ( من السيبروفلوكساسين والنورفلوكساسين)، حيث تتضاعف قيم MIC من 32 إلى 64 ضعفاً. في حين لا تؤثر هذه الآلية على الكينولونات الأقل حياً للماء (ليفوفلوكساسين وموكسيفلوكساسين سبارفلوكساسين) أو تلك الكارهة للماء (حمض الناليديكسيك) [43]. يتألف بروتين QepA العابر للغشاء transmembrane من 511 حمض أميني، ترمز له المورثة *qepA* التي تشكل جزءاً من إنتغرون ولها نمطين *qepA1*, *qepA2* [66]، (شكل 10)





شكل (10) : البنية الثانوية لبروتين QepA

#### 4.1. التآزر بين آليات المقاومة للكينولونات:

تميزت الكينولونات المفلورة عن باقي الصادات بضرورة حدوث التآزر بين آليات المقاومة المختلفة أو حدوث طفرتين على الأقل للحصول على مقاومة سريرية [34, 67]، فلذا إفترضنا أن كلا أنزيمي التوبوايزوميراز والجيراز حساس للكينولونات في إحدى العزلات الجرثومية، فإن طفرة واحدة في أحد الأنزيمين تؤدي فقط لمقاومة معتدلة، وللوصول إلى مقاومة عالية يجب أن تحصل طفرة على كلا الأ أنزيمين، أو يكفي أن تتراكم الطفرات في نفس الأنزيم وصولاً إلى المقاومة السريرية [10].

يمكن للتآزر بين الطفرات الصبغية أن يتم عندما تترافق طفرات *gyrA* مع المضخات الطارحة [68]، ففي دراسة تمت على النمط الطبيعي wild type للزوائف بلغ التركيز المثبط الأدنى لأحد الكينولونات (ليفوفلوكساسين) 0.25 مكغ/مل، وعند وجود مورثات *gyrA* طافرة يصل التركيز إلى (1-2) مكغ/مل، كما أن وجود الطفرات المسؤولة عن فرط التعبير عن المضخات الطارحة تؤدي إلى وصول التركيز إلى (1-4) مكغ/مل، أما العزلات التي تحوي على كلا النوعين السابقين من الطفرات أدت لإرتفاع تركيز الـ MIC إلى (8-32) مكغ/مل [69].

من ناحية أخرى فإن التآزر لا يقتصر على المورثات الصبغية وإنما يمكن أن يتم بين مورثات مقاومة بلازميدية وأخرى صبغية، مما يسرع من حدوث مقاومة مع ارتفاع في قيمة MIC للسيبيروفلوكساسين بما يقارب 32 ضعف [70]، ويبدو ذلك جلياً عندما يتم الإقتران بين السلالات الجرثومية التي تحوي أصلاً على 1 لبلازميد المقاوم (المانحة donor) وأخرى خالية، فيلاحظ إنخفاض في سوية المقاومة (16-128 ضعفاً) ، مما يدل على وجود آلية إضافية للمقاومة (طفرات صبغية في مورثات الـ *gyrA* و *parC* أو البورينات) بالتزامن مع وجود *qnr* [5].

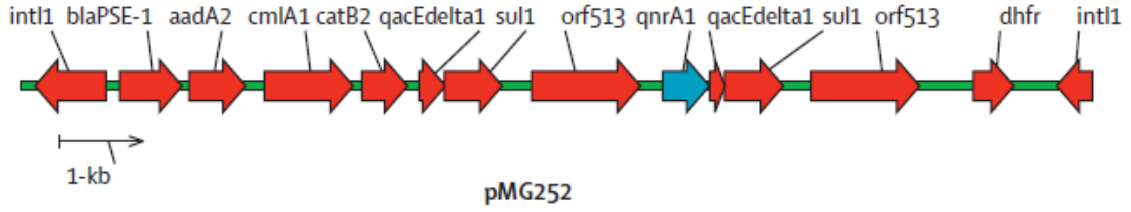
أما في حال وجود عدة أنواع من مورثات *qnr* عند نفس السلالة الجرثومية فالأمر مختلف ولا يوجد تأثير تآزري لتلك المورثات حسب إحدى الدراسات، حيث أبدت العزلات التي تحوي إحدى المورثتين أو كليهما نفس السوية من MIC للسيبروفلوكساسين [71].

### 5.1. البلازميدات الحامل لمورثات PMQR :

تعرف البلازميدات على أنها جزيئات دنا جرثومية غير صبغية extragenomic مكونة من دنا حلقي مضاعف الطاق، وهي قادرة على التضاعف الذاتي بشكل مستقل عن الصبغي، ومن الممكن أن تحتوي الخلية الواحدة على أكثر من نسخة من البلازميد، ولا تكتفي الخلية بنوع واحد من البلازميدات إنما يتعداها إلى العديد من الأنواع البلازميدية. تختلف البلازميدات في حجمها فهي تتراوح بين (5-100) ألف زوج أساس kbp، لا تحتوي البلازميدات على مورثات مسؤولة عن الوظائف الضرورية للهمو الجرثومي بل تحوي على مورثات تمنحها ميزات انتقائية لحماية الخلية ال جرثومية كالمورثات التي تمنح صفة المقاومة للصادات الحيوية ، اصطناع الصادات الحيوية والسموم والبروتينات المسؤولة عن الأمراض، وكذلك صفة اصطناع الأنزيمات التي تسهل من الحصول على الكربون من مصادر غير تقليدية، والمقاومة للمعادن الثقيلة [16].

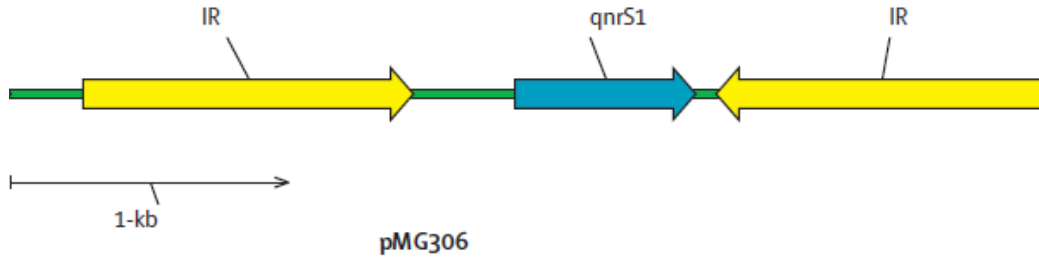
وجدت أول مورثة من نوع *qnr* محمولة على بلازميد دعي باسم pMG252، وهو واسع الانتشار وقابل للانتقال بسهولة عبر الأنواع الجرثومية، تختلف البلازميدات الحاملة لتلك المورثات في حجمها بشكل واسع (أكثر من 50 ألف زوج أساس) ولكن معظمها يحمل عدة مورثات للمقاومة بنفس الوقت مثل *aad*، *bla*، *cat* أو *cmlA1*، *sulI* أو *dhfr*، *qacEΔ1*، والتي ترمز لبروتينات المسؤولة عن المقاومة للأمينوغلوكونيدات، صادات البيبتاكتام، الكلورامفينيكول، السلفوناميدات، ومركبات الأمونيوم الرباعية على الترتيب. ويشير وجود المورثات السابقة على بلازميد واحد إلى خطورة حدوث المقاومة لأي من الصادات الحيوية السابقة وبالتالي سيؤدي إلى مقاومة للصادات الأخرى المحمولة على نفس البلازميد [4].

تشكل مورثات *qnrA* وفي بعض الأحيان *qnrB* جزءاً من إنتغرون يحمل على بلازميد المقاومة [5]، وتعرف الإنتغرونات بأنها منظومة وراثية قادرة على النقاط عدة مورثات للمقاومة عبر موقع إغتراز (*intI1*) يقوم بحذف أو إدخال أي مورثات إضافية [72, 73]، كما يحوي الإنتغرون على موقع *Orf513* مسؤول عن تجميع مورثات المقاومة بشرط يدعى gene cassette [74] شكل (11)



شكل(11) : بنية الإنتغرون المحمول على بلازميد pMG252 والذي يحوي على مورثة *qnrA*

أما مورثة *qnrS* فهي لا تشكل جزءاً من إنتغرون ولكن لوحظ أنها تحمل على ينقول transposon [4] يملك القدرة على التحرك الذاتي والانتقال من مكان ما على الصبغي إلى مكان آخر على نفس الصبغي أو على بلازميد آخر وبالعكس ليستمر بالتضاعف مع الخلية، وذلك خلافاً للإنتغرون الذي لا يملك المقدرة على الانتقال وإنما يتحرك بواسطة البلازميد [47](شكل 12).



شكل(12) : مورثة *qnrS* محاطة بـ تكرارات مقلوبة IR=invrted repeat

كما هو الحال بالنسبة لمورثات *qnr*، تشكل مورثة *aac(6')-Ib* جزءاً من إنتغرون محمول على بلازميد وتوجد غالباً مع مورثات أخرى مثل *qnrB* و *qnrA* ومورثات مقاومة لصادات البيبتاكتام ESBL [45] شكل (9)

### 6.1. الأهمية السريرية لمورثات PMQR :

تأتي أهمية إكتشاف مورثات PMQR بكونها محمولة على عناصر وراثية نقالة كالبلازميدات أو اليقنولات، مما يؤمن سرعة انتقالها بشكل أكبر من تلك المحمولة على الصبغيات، إضافة إلى إمكانية نقل عدة مورثات للمقاومة بشكل أفقي بين الأنواع الجرثومية المختلفة مما يزيد من إمكانية حدوث مقاومة متعددة [4].

من جهة أخرى، تفسر تلك المورثات تحول سلالات جرثومية من حساسة للكينولونات إلى مقاومة لها، فوجود عزلات جرثومية حساسة للكينولونات (وفق معايير Clinical and Laboratory Standards Institute) وتحمل مورثات *qnr* بنفس الوقت يعد أمراً مثيراً للقلق بسبب قابلية تلك العزلات لتطوي مقاومة في الزجاج in vitro، ولقد تم البرهان على ما سبق عبر التزاوج الجرثومي conjugation الذي يتضمن نقل

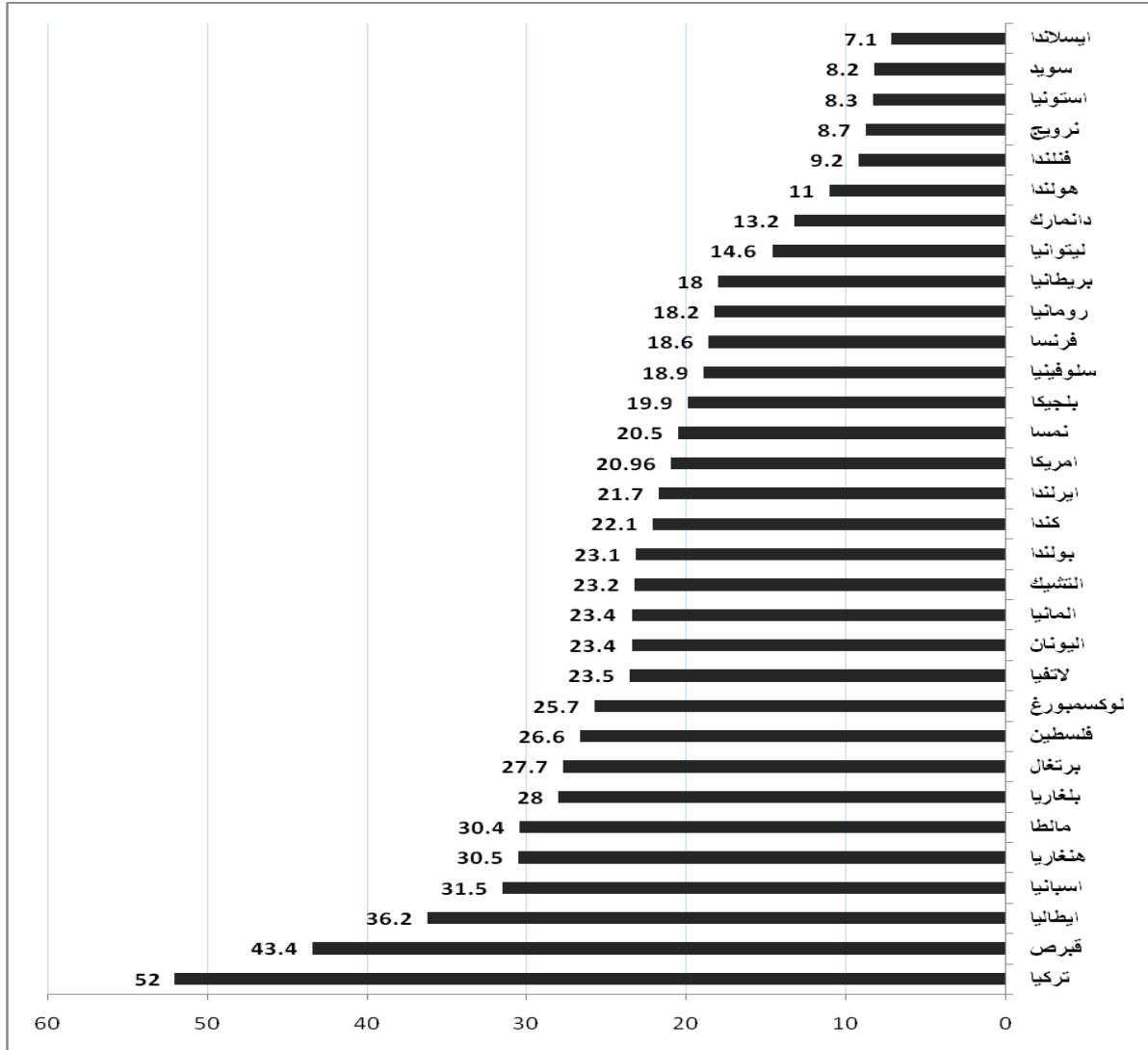
البلازميدات الحاملة لمورثات *qnr* إلى عزلات جرثومية خالية من *qnr* ثم تعريض هذه الأخيرة لتراكيز علاجية من الكينولونات مما يؤدي لاكتساب طفرات صبغية وبالتالي مقاومة عالية المستوى [75].

كما تشير الدراسات إلى وجود علاقة قوية بين مورثات المقاومة للكينولونات ومورثات المقاومة للأجيال الحديثة من السيفالوسبورينات والتي تؤدي إلى ظهور المقاومة المتعددة للصادات الحيوية في السلالات الجرثومية [74, 76]، ولقد أثبتت الدراسة [75] وجود *qnrA* مع أحد مورثات ESBL على إنتغرون واحد مما يشير لإكتسابهما سوية.

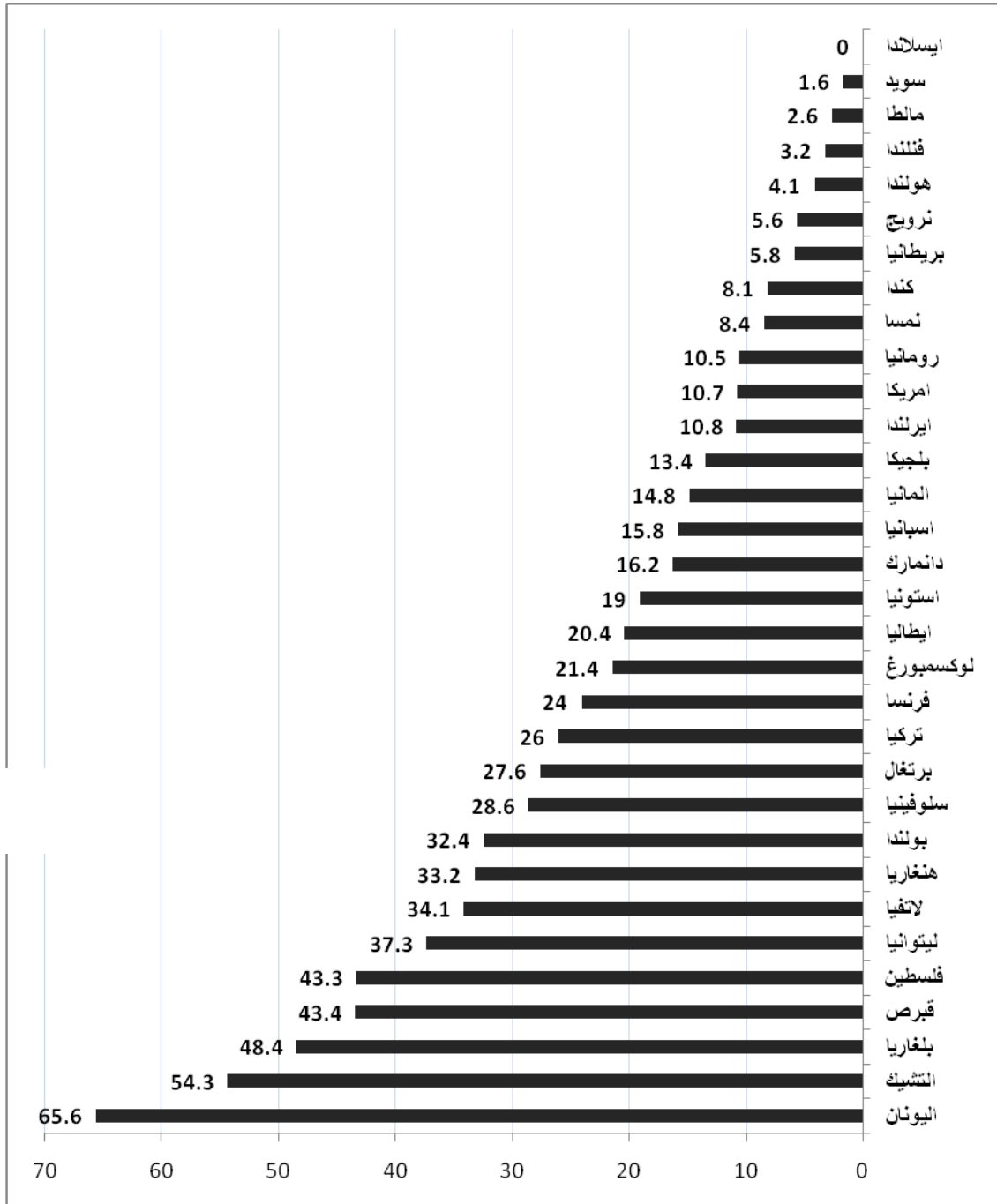
تكمن خطورة هذا الترابط كونه يؤدي إلى مقاومة زميرتين كبيرتين من الصادات، وباعتبار أن الصادات السابقة تشكل الخيار الاول في العديد من الإنتانات (البولية، الصدرية،...) بالتالي سيكون أمام المريض خيارات علاجية محدودة جداً، وعلى الأطباء أن يدركوا أن استخدام الكينولونات لا يؤدي فقط إلى مقاومة الكينولونات ولكن إلى مقاومة صادات أخرى كالسيفالوسبورينات ، إضافة لأي مورثات أخرى مقاومة محمولة على ذلك البلازميد كالأمينوغليكوزيدات مثلاً [4].

## 2. الأبحاث السابقة

لقد مضى على استخدام الكينولونات كصادات حيوية ما يفوق الثلاثين عاماً ، تراكمت مع ازدياد واضح في نسب المقاومة [77]. حيث تراوحت نسب المقاومة للكينولونات المفلورة عند الإشريكية القولونية من 7.1% في ايسلاندا إلى 52% في تركيا شكل (13)، أما عند الكليسييلة الرئوية فقد تراوحت النسب بين 0.0% في ايسلاندا إلى 65.6% في اليونان [78] شكل(14)، وفي الشرق الاقصى (هونغ كونغ 2006) بلغت نسبة المقاومة عند الإشريكية 40% [79].



شكل(13) " النسب المئوية لمقاومة الكينولونات المفلورة عند الإشريكية القولونية (2009)



شكل (14) : النسب المئوية لمقاومة الكينولونات المفطورة عند الكليبيسيلة الرئوية (2009)

تم اختيار السيبروفلوكساسين من بين الكينولونات في الدراسة الحالية باعتباره من أكثر الكينولونات المفطورة استخداماً حول العالم [80, 81]، وقد ترافق استخدامه الواسع مع ظهور أعداد متزايدة من سلالات الإشريكية والكليبيسيلة المقاومة [22]. بينت المراجع اختلاف نسب المقاومة للسيبروفلوكساسين عند الإشريكية القولونية عبر البلدان المختلفة، فقد تقاربت النسب في كل من سوريا وتركيا ولبنان، إذ بلغت (40%، 41%، 41.77%) في

حين كانت أقل نسبياً في كل من السعودية وتبعثها مصر ومن ثم الأردن (37.5%، 35%، 28%) على التوالي [84،83،82].

لقد ارتبط اسم الإشريكية القولونية بحدوث الإنتانات المعوية كما حصل في ألمانيا عام 2011، عندما تسببت بحدوث جائحات جرثومية bacterial outbreak انتشرت إلى أجزاء واسعة من القارة الأوروبية [85]. تعد الإشريكية القولونية مسؤولة عما يقارب 90% من حالات إنتانات السبيل البولي [86]، تليها الكليسييلة الرئوية ويأتي في المرتبة الثانية بعد الإشريكية القولونية كعامل مسبب للإصابة البولية في المستشفيات بنسبة 6-17% [87]، كما تساهم الكليسييلة الرئوية في حدوث الأمراض الرئوية بنسبة 7-14% وهي المسؤولة عن حدوث تجرثم الدم septicaemia بنسبة 4-15% الناتج عن استخدام الأجهزة الوعائية، وترتبط الكليسييلة الرئوية مع أنواع مختلفة من الأمراض فمن الممكن أن تسبب ذات الرئة الجرثومي المكتسب الملاحظ عند مدمني الكحول المزمنين وبشكل خاص الرجال الكبار بالسن والذي يؤدي للموت في حال عدم معالجته [88].

لقد تم اختيار الإشريكية القولونية والكليسييلة الرئوية باعتبارهما من أكثر الجراثيم احتواءً لمورثات المقاومة من النوع PMQR [89]، فهي تحتوي على بلازميدات متعددة المقاومة للصادات الحيوية والتي تقوم بنقله إلى أنواع جرثومية أخرى عبر الانتقال الأفقي للمورثات horizontal gene transfer HGT، حيث تعد تلك الجراثيم مخزن لاستقبال ونقل بلازميدات المقاومة [90، 91].

ركزت هذه الدراسة على انتقاء العزلات المنتجة لأنزيمات ESBL والتي تكون مقاومة لكل من البنسلينات والسيفالوسبورينات ومركبات المونوباكتام بسبب الارتباط بين إنتاج تلك الأنزيمات ووجود مورثات المقاومة PMQR الذي أثبتته العديد من الدراسات [4، 45، 92، 93]، وآخرها ما أكدته أيضاً الدراسة السورية المنشورة في مجلة بحوث جامعة حلب والتي قارنت بين نسب المقاومة للصادات عند الإشريكية القولونية والكليسييلة الرئوية المنتجة وغير المنتجة لأنزيمات بيتا-لاكتاماز ممتدة الطيف، حيث أبدت عزلات الإشريكية القولونية و الكليسييلة الرئوية المنتجة لهذه الأنزيمات نسب مقاومة أعلى للسيبروفلوكساسين بلغت 56%، 36% مقارنة مع العزلات غير المنتجة 13.8%، 0% على الترتيب [82].

لقد أجريت العديد من الدراسات التي اهتمت بمورثات PMQR منذ اكتشاف مورثة *qnrA* في تسعينيات القرن الماضي، فقد قام العالم Jacoby ورفاقه بدراسة انتشار مورثات *qnrA* ضمن عزلات من الإشريكية القولونية والكليسييلة تم جمعها من تسع عشرة دولة حول العالم وتبين أن تلك المورثات تنتزع جغرافياً في الولايات المتحدة فقط بنسبة 18% [94]، ولكن أثبتت دراسة أخرى وجود تلك المورثات في الصين ضمن عزلات من الإشريكية القولونية منتجة للـ ESBL بالترافق مع مورثات *aac(6')-Ib-cr* [64]، و تم في دراسة فرنسية أول اكتشاف

لمورثة *qnrS* ضمن بنية ينقول [46]، وأول اكتشاف لمورثة *qnrB* كان في دراسة هندية بنسبة 4% [48]، وفي دراسة أجريت على 110 عزلات مقاومة للسيبروفلوكساسين ( 38 الإشريكية القولونية و72 الكليبيسيلة الرئوية) تبين وجود مورثة *qnrA* في 8 عزلات من الكليبيسيلة فقط وعدم وجودها ضمن الإشريكية [95]، وأكدت دراسة امريكية على عدم وجود مورثات *qnr* ضمن عزلات من السالمونيللا مقاومة للسيبروفلوكساسين [47].

كما تم تحديد علاقة مورثات PMQR بالمقاومة الظاهرية في عدة دراسات، فقد قامت دراسة كورية و على مدى 9 سنوات (1998-2006) بتحري انتشار مورثات PMQR ضمن عزلات من الأ معائيات ولوحظ زيادة في انتشار مورثات PMQR مع الزمن مع وجود زيادة هامة في معدل مقاومة السيبروفلوكساسين مع الزمن ( $P < 0.001$ ). ولتحديد المورثات المسؤولة عن المقاومة تم دراسة انتشار الطفرات الصبغية مع الزمن ولوحظ زيادة في انتشار الطفرات الصبغية ضمن العزلات الحاملة لمورثات PMQR مع الزمن ( $P = 0.012$ ) بينما كان الانتشار ثابتاً ضمن العزلات غير الحاوية على مورثات PMQR المحمولة على البلازميد، واستنتجت الدراسة بأن مورثات PMQR لها دور في حدوث الطفرات الصبغية وزيادة المقاومة للسيبروفلوكساسين [65].

من جهة أخرى أكدت إحدى الدراسات الأمريكية التي أجريت خلال الأعوام 1999-2004 على 313 عزلة تابعة للأجناس (أمعائيات ، إشريكية قولونية، كليبيسيلة رئوية ) وتملك  $MIC \leq 0.25$  للسيبروفلوكساسين ومقاومة للسيفتازيديم، أن مورثات *qnr* كانت الأكثر انتشاراً ضمن الإمعائية *Enterobacter spp* 31% تلتها الكليبيسيلة الرئوية 20% وأخيراً الإشريكية القولونية 4% ، وفي دراسة أمريكية أخرى كانت مورثات *aac(6')-Ib-cr* أكثر انتشاراً ضمن الإشريكية القولونية 31.9% تليها الكليبيسيلة 16% وأخيراً الامعائية 7.5%، ولم تجد الدراسة أي علاقة تربط وجود مورثة *aac(6')-Ib-cr* مع وجود مورثات *qnr* [96, 97]، أما الدراسة الكندية التي أجريت على عزلات من الأ معائيات المقاومة للسيبروفلوكساسين فتبين أن مورثات *aac(6')-Ib-cr* ومورثات *qnrS* تتواجد فقط ضمن العزلات المنتجة لأنزيمات ESBL [98] ، وفي دراسة ألمانية أجريت على 177 عزلة منتجة لأنزيمات ESBL ( 102 إشريكية، 75 كليبيسيلة) توزعت مورثة *aac(6')-Ib-cr* بشكل متساو بين العزلات الجرثومية [99]، وفي دراسة سلوفينية أجريت على عزلات كليبيسيلة رئوية منتجة لأنزيمات ESBL تبين أن العزلات الحاوية على مورثات *aac(6')-Ib-cr* كلها مقاومة للسيبروفلوكساسين [100]، وفي دراسة أخرى أجريت في مدينة القدس أظهرت أن وجود مورثات *aac(6')-Ib-cr* يترافق مع زيادة المقاومة تجاه السيبروفلوكساسين [101].



### 3. أهمية البحث

تتجلى أهمية البحث كونه يدرس ظاهرة متغيرة بتغير الزمان والمكان وهي ظاهرة تناقص الحساسية الجرثومية للصادات الحيوية التي أصبحت مصدر قلق ومشكلة تهدد الصحة العامة، وخاصة أن هذه المشكلة تزداد سوءاً مع مرور الزمن كما تشير العديد من الدراسات، وهذا هو إرث العقود السابقة من الاستخدام غير الرشيد لصادات الحيوية والإفراط في استخدامها . ولقد ترافق الاستخدام المكثف للكينولونات عند البشر أو الحيوانات، باعتبارها صادات رخيصة الثمن إضافة إلى صرفها بدون وصفة طبية من قبل الصيدلة، مع ظهور سلالات جرثومية مقاومة من الإشريكية القولونية والكلبيسيلا الرئوية .

ويعد التحري عن وجود المورثات المسؤولة عن مقاومة الكينولونات المحمولة على البلازميد ذو أهمية خاصة كونه يؤمن معدل أسرع لانتقال تلك المورثات بين الأنواع الجرثومية المختلفة أو بين سلالات النوع الواحد (انتشار أفقي) مما يساعد في تفشي المقاومة .

### 4. أهداف البحث:

تعتبر الأمعائيات من عوامل الإراضية الشائعة وذات مقاومة لعدة صادات حيوية بما فيها السيبروفلوكساسين الذي شاع استخدامه في الآونة الأخيرة ، لذلك سنعمد في دراستنا إلى :

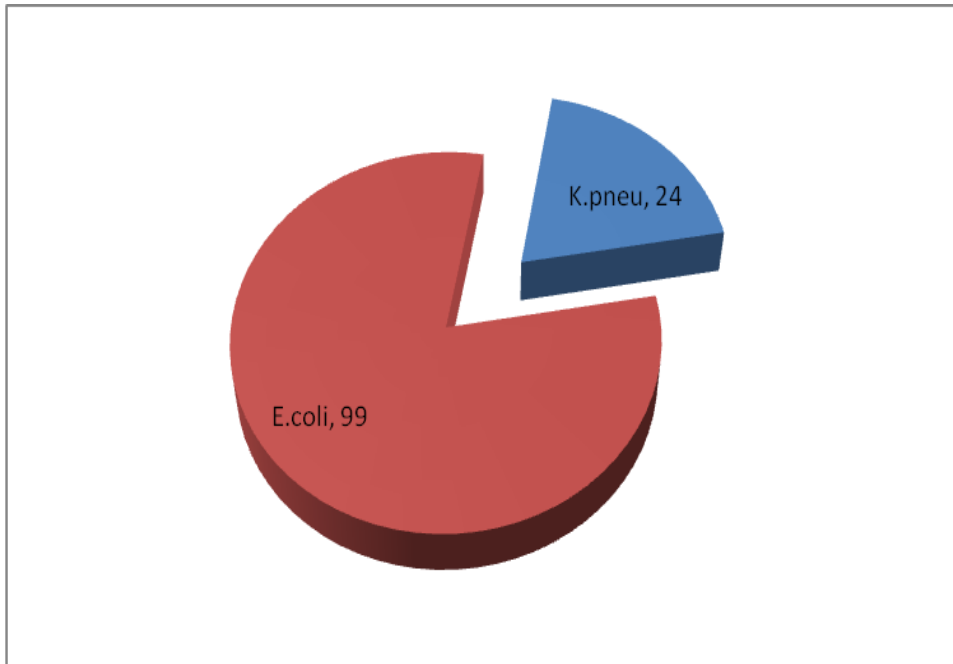
- تحديد نسبة حساسية ومقاومة عزلات من الإشريكية القولونية والكلبيسيلا الرئوية المنتجة لأنزيمات ESBL تجاه صادات السيبروفلوكساسين.
- تحري مدى انتشار مورثات المقاومة PMQR (*qepA*، *qnrS*، *qnrB*، *qnrA*، *aac(6')-Ib*) المحمولة على البلازميد ضمن العزلات المستخدمة .
- تحري وجود آليات أخرى للمقاومة تتضمن طفرات في مورثة *aac(6')-Ib* المسؤولة عن مقاومة السيبروفلوكساسين.
- تحديد دور مورثات PMQR في حدوث المقاومة للسيبروفلوكساسين وذلك عن طريق دراسة العلاقة التي تربط بين النمط الظاهري والنمط الوراثي للعزلات بطرق إحصائية .

## القسم العملي

## 5. مواد وطرائق البحث :Materials and Methods

أجريت هذه الدراسة على عزلات جرثومية منتجة لأنزيمات Extended-Spectrum Beta- ESBL Lactamase ، معزولة من مرضى مشافي حلب الجامعية (الباسل، الجامعة، الكندي)، وتم الحصول على تلك العزلات من دراسة سابقة [82]، وكانت العزلات محفوظة ضمن أنابيب خاصة micro vials تحوي على خرزات مسامية porous beads في درجة حرارة -80 °C .

ضمت العينات 99 عزلة من الإشريكية القولونية و 24 عزلة من الكليبييلة الرئوية والمعزولة من السوائل الحيوية المختلفة (شكل 15)



الشكل (15) : عدد العزلات الجرثومية لكل من الكليبييلة الرئوية و الإشريكية القولونية

تم تقسيم العمل على جزأين رئيسيين وهما دراسة الحساسية الظاهرية للعزلات ال جرثومية ثم تحري وجود مورثات المقاومة.

### 1.5. دراسة حساسية العزلات الجرثومية تجاه ال سيبروفلوكساسين بطريقة التمديد microdillution :method

يتمتع هذا الاختبار بحساسية عالية مقارنة مع اختبار التحسس البسيط بطريقة الانتشار بالأقراص ، ويعد الاختبار بالتمديد طريقة موثوقة مرجعياً توصي بها اللجنة الاوربية لاختبار الحساسية الجرثومية EUCAST

(European committee for antimicrobial susceptibility testing)، و يمكن من خلالها

معرفة تركيز الصاد الذي يؤثر في الخلية الجرثومية [102].

يعتمد مبدأ هذه الاختبار على تحضير سلسلة من التراكيز المتدرجة للصاد الحيوي المدروس تحوي تراكيز محددة من المعلق الجرثومي، نستطيع من خلالها تحديد MIC م كغ/مل (التركيز المثبط الاصغري) ويعرف بأنه أقل تركيز من الصاد الحيوي الذي يثبط النمو الجرثومي للمتعضيات الدقيقة بعد فترة حضان محددة.

وقد تم تحديد نقاط القطع للسيبروفلوكساسين (MIC Break points) حسب معهد المعايير السريرية و المخبرية CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) والذي كان يعرف سابقا ب اللجنة الوطنية لمعايير المخبر السريري [103] National Committee For Clinical Laboratory Standards (NCCLS) والذي يعتبر أن النوع الجرثومي مقاوم (R) اذا كان  $MIC \leq 4$  مكغ/مل أو متوسط الحساسية (I) MIC Intermediate = 2 مكغ/مل أو حساس (S) اذا كان  $MIC \geq 1$  مكغ/مل.

كما تم اختيار مجال تركيز السيبروفلوكساسين ليحتوي نقاط القطع السابقة وبالتالي سيتمت المجال من 1/16- 256 مكغ/مل، كما تم اعتماد السلالات المرجعية *K. pneumoniae* ATCC 700603 و *E. coli* ATCC 25922 كشاهد ايجابي (ملحق 1).

## تحضير المواد

### -أوساط الزرع:

يمكن أن تنمى أغلب الجراثيم في وسط زرع ي سائل او صلب، ويجب أن يحتوي وسط الزرع مزيجاً متوازناً من المواد الضرورية وتراكيز محددة من أجل السماح للجراثيم بالنمو والانقسام بفعالية. وتحضر الاوساط الزرعية عن طريق تعليق وزن محدد من المسحوق المجفف في 1 L من الماء المقطر، ثم يوضع المزيج السابق في الصاد الموحد autoclave على الدرجة  $121C^{\circ}$  مئوية لمدة 15 min. ولتحضير أطباق بتري يبرد الوسط السابق حتى تصبح درجة حرارته ما بين  $50-55 C^{\circ}$ ، ثم يسكب في أطباق بتري معقمة، نترك الأطباق حتى يئصلب وسط الزرع، ثم يتم لصق أغطية الأطباق بواسطة شريط من البارافيلم وتوضع في الثلاجة عند الدرجة  $4 C^{\circ}$  لحين استخدامها.

- الأغار المغذي (Nutrient Agar (N.A) - شركة (Criterion): يتألف هذا الوسط من آغار و مواد مغذية ( خلاصة البنكرياس ، خلاصة لحم البقر) والتي تعد ضرورية لانقسام و نمو عدد كبير من الكائنات الحية الدقيقة ، يتم تحضير الوسط باضافة 23 g من المسحوق إلى لتر ماء مقطر .
- مرق مولر هينتون Mueller-Hinton broth من صنع شركة USA،Sigma : وسط سائل لاجراء اختبار التحسس بطريقة التمديد، يحضر باضافة 22 g من المسحوق إلى واحد لتر من الماء المقطر .

## - محاليل اختبار التحسس الجرثومي :

- محلول سيبروفلوكساسين 0.2% (200 ملغ/100 مل) بشكل فيال سائل liquid vial
- يؤخذ 1 مل من محلول السيبروفلوكساسين ذو التركيز 1024 مكغ/مل ابتداء من محلول خزين Stock solution بتركيز 0.2% (حسب قانون التمديد) وذلك بإضافة 512 مكمل من المحلول السابق والتمديد حتى 1 مل بمرق مولر هينتون ، وسيخضع هذا المحلول لعملية تمديد مضاعف خلال مراحل العمل وصولاً إلى التركيز 256 مكغ/مل.
- محلول عياري McFarland 0.5: يحضر بإضافة 0.05 مل من محلول كلوريد الباريوم (1.175% وزن/حجم) إلى 9.95 مل من محلول حمض الكبريت 1 %، ويجب أن تكون الكثافة الضوئية للمحلول المحضر بهذه الطريقة OD بين 0.08 و 0.1 مقروءة في موجة طولها 625 نانومتر، يحفظ المحلول بدرجة حرارة الغرفة بالظلام (بتغليف الأنبوب بورق ألومنيوم).
- معلق جرثومي يحضر بلختيار خمس مستعمرات متشابهة شكلاً وتعلق في محلول ملحي 0.9% بكثافة مكافئ McFarland 0.5 وهذه الدرجة من العكارة تعني وجود حمولة جرثومية في المعلق تساوي تقريباً  $1.5 \times 10^8$  CFU/ml (colony forming unit)، نمدد المعلق السابق حوالي مئة مرة (0.1 مل معلق يضاف إلى 9.9 مل مرقي مولر هينتون) ويصبح التركيز النهائي  $1 \times 10^6$  CFU/ml

## -الأجهزة المستخدمة:

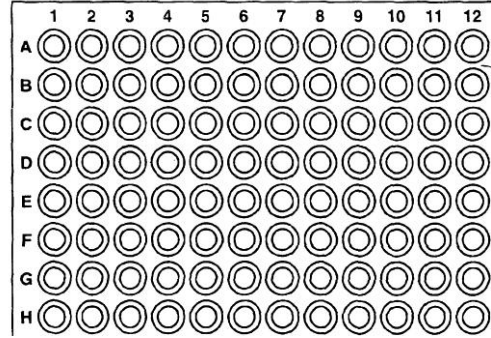
- صاد موصل: Autoclave ALPCo, Japan
- حجرة الزرع (ΔLab Tech) Laminar Flow Clean Bench I تجري ضمنها كل عمليات الزرع والتحصن الجرثومي ذات تيار هوائي عمودي ومزودة بمصباح عادي و UV مع نظام انذار للتحكم بالفلتر او استبداله
- أطباق خاصة للتحسس الجرثومي 96 Microplate حجرة
- جهاز قارئ إيزا آلي ELx808 Absorbance Microplate Reader
- ماصات أحادية أو ثمانية (8-Channel Pipettes) بأحجام مختلفة 1000، 200، 100، 20، 10 مكمل، مع رؤوس موافقة.

## - طريقة العمل

- i. تترع العزلات على أوساط مغذية، و تحضن طوال الليل بحرارة  $C^{\circ} / 37$  (يجب ألا تتجاوز 30 ساعة)
- ii. نقلأ الحجرات بـ 100 ملغ من مرق مولر هينتون بشكل متساو .
- iii. يضاف 100 مكل من محلول السيبروفلوكساسين في الحجرة الأولى من الصفيحة ذو التركيز 1024 مكغ/مل.
- iv. يُنقل بواسطة ممص بلاستيكي عقيم 100 مكل من الحجرة الأولى 1 (ذات التركيز 512 مكغ/مل) ويوضع في الحجرة الثانية (2)، ثم يؤخذ 100 مكل من الثانية إلى الثالثة، وهكذا .. حتى نصل إلى الحجرة الأخيرة (10) ، عندها يؤخذ 100 مكل منه ويرمى جانبا، وبهذا يخضع السيبروفلوكساسين إلى أول عملية تمديد و نحصل على سلسلة من عشر تمديدات 512..... ويكون حجم المحلول في كل الحجرات 100 مكل.
- v. بعدها يتم إضافة 100 مكل من المعلق الجرثومي السابق ذو التركيز ( $1 \times 10^6$  CFU/ml) بكل حجرة وبالتالي نحصل على مع لق نهائي بتركيز  $0.5 \times 10^5$  CFU/ml ضمن جميع الحجرات، ويخضع السيبروفلوكساسين إلى عملية تمديد ثانية لنحصل على سلسلة تمديدات تبدأ بـ 256 مكغ/مل وصولاً إلى 1/8 مكغ/مل وحجم يساوي 200 مكل/حجرة.
- vi. يجب أن تحتوي أحد الحجرات على لقاحه جرثومية فقط بدون صاد حيوي لا اعتباره شاهد إيجابي على النمو (حجرة 11)، كما يجب ان تكون أحد الحجرات خالية من اللقاحه الجرثومية كشاهد سلبي (حجرة 12).
- vii. يتم حضن الأطباق بدرجة حرارة  $C^{\circ} / 37$  لمدة /20-16/ ساعة، بعدها يتم قراءة النتيجة في جهاز الإليزا لمعرفة الحجرة التي توقف عندها النمو .
- viii. يتم تحديد MIC عند الحجرة التي توافق أقل تركيز من الصاد الذي يثبط النمو بشكل كامل، وتكون القراءة كالتالي :  
**الحجرة رائقة:** أنثر الصاد في الخلية الجرثومية.  
**الحجرة عكرة:** لم يؤثر الصاد في الخلية الجرثومية.  
فلو كانت الحجرة ذات التركيز 8 مكغ/مل رائقة والحجرة ذات التركيز 4 مكغ/مل عكرة فإن MIC لهذا الصاد يكون 8 مكغ/مل، ومن البديهي في هذا المثال أن تكون جميع الحجرات ذات التركيز الأعلى من 8 مكغ/مل رائقة وإلا فهناك خطأ ويجب عندها إعادة الاختبار .
- ix. يتم إجراء الخطوة السابقة على كل صف في الطبق وتمثل كل عزلة من العزلات المدروسة بحرف أبجدي (A-B-....H) ، أما التراكيز فقد توزعت على الأعمدة من رقم (1-12)(شكل 16)

x. تتم إعادة النتيجة عند عدم وجود تدرج في النمو الجرثومي أو في حال نمو في كامل الحجرات أو انعدام النمو تماماً.

xi. قبل قراءة النتيجة يجب التأكد من ظهور نمو واضح للقاحة الجرثومية (عكارة) في الشاهد الايجابي، وعدم النمو في الشاهد السلبي



الشكل (16) : الصفيحة microplate الخاصة بلختبار حساسية العزلات الجرثومية بطريقة التمديد.

## 2.5. دراسة مورثات المقاومة

ويتضمن استخلاص الدنا الجرثومي - تفاعل تضخيم المورثات الهدف - البحث عن الأنواع الطافرة

### 1.2.5. استخلاص الدنا الجرثومي:

- المواد المستخدمة

- وسط آغار المغذي (N.A) Nutrient Agar
- وسط مرق Luria broth المغذي والضروري لزراع الجراثيم أثناء العمل بقسم البيولوجيا الجزيئية لاستخلاص كل من الجينوم والبلازميد

• كيت استخلاص البلازميدات plasmid extraction kit:

QIAPrep Spin Miniprep Kit, Qiagen, USA

• كيت استخلاص الجينوم genome extraction kit:

GeneJET Genomic DNA Purification Kit, Thermo Scientific

- الأجهزة المستخدمة

مثقلة دقيقة خاصة بأنابيب إندورف 0.2/1.5/2 ml:

(himac CT5RE tabletop centrifuge; HITACHI, Japan).

### 1.1.2.5. استخراج البلازميد Plasmid extraction:

تم تنشيط الجراثيم بإعادة زرعها على وسط الآغار المغذي الصلب و وضعها بالحاضنة لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة (37C°)، ثم أخذت مستعمرة مرفردة كبيرة باستخدام عود خشبي toothpick معقم، وزرعت في أنبوب بحجم 500ml يحوي (1-5 ml) وسط سائل هو Luria Broth medium (LB) معقم و مبرد لدرجة الحرارة 55 C° ومضاف له الأمبيسيلين (الصاد الحيوي الحساسة له) بتركيز 100مكغ/مل، ( وذلك ابتداء من محلول تخزين stock solution بتركيز 50 mg/ml موضوع في أنبوب عاتم ومحفوظ في درجة حرارة (4 C°-) لحين الاستخدام).

تم بعد ذلك حضن الأنابيب المزروعة لمدة 12-16 ساعة بدرجة حرارة (37C°) بالترافق مع اهتزاز قوي لوسط الزرع (حتى يتم الحصول على الجراثيم وهي في الطور اللوغاريتمي للنمو لضمان الحصول على أكبر كمية ممكنة من البلازميدات)، ثم نثقل العينة الناتجة لأكثر من 8000 rpm (6800 x g) لمدة ثلاث دقائق في درجة حرارة الغرفة (15-25C°) للحصول على الحلاية الجرثومية bacterial lysate.

تم في النهاية تطبيق التعليمات الواردة في الكيت الخاص باستخلاص البلازميد، والذي يعتمد على الاستخلاص بالطور الصلب باستخدام أعمدة من السيليكا، بعد حل الجراثيم بمحاليل قلوية، ثم تعديل المحلول الناتج و إضافة ملح قوي الارتباط لتصبح العينة جاهزة للتنقية بعد ادمصاصها على أغشية السيليكا في الأنابيب الموجودة في الكيت، ثم غسل المحلول الناتج بعدة محاليل وبعدها تم امتلاص elution المحلول الذي يحوي البلازميدات.

### 2.1.2.5. استخراج الجينوم Genome extraction:

بالرغم من توفر عدة طرق لاستخلاص الدنا الجينومي إلا أنه تم اختيار (كما في البلازميد) طريقة التنقية بالأعمدة والتي تعتبر من أكثر الطرق شيوعاً لسهولة وسرعتها وقابليتها للتطبيق، إضافة إلى الحصول على خلاصات نقية ذات مردود أعلى من طريقة الترسيب والتي يبقى فيها جزء من الدنا منحلاً [104]، كما لا تتطلب هذه الطريقة استخدام الراتينات غالية الثمن أو استخدام محلات سامة كالكلوروفوم والفينول والتي يمكن أن تثبط تفاعل PCR [105, 106].

تم اتباع نفس الخطوات السابق للحصول على الحلاية الجرثومية ومن ثم تتبع بعزل الدنا الجينومي من العزلات النامية بطريقة الكيت GeneJET Genomic DNA Purification Kit وفق معايير و توجيهات الشركة المصنعة بوساطة بروتوكول خاص مرفق (الملحق 3) ويعتمد الكيت على الاستخلاص بالطور الصلب باستعمال أعمدة تحوي على فيلم رقيق من السيليكا لربط الدنا.



## المبدأ:

- إضافة المحلول الحال (لهضم الأغشية الخلوية) إلى عمود التنقية المركب بشكل مسبق على أنبوب جمع 2ml.
- إزالة الـ RNA عن طريق إضافة الـ RNase A.
- التخلص من الشوائب باستخدام محاليل الغسل المحضرة wash buffers.
- أخيراً، شطف الـ DNA المرتبط بعمود السليكا باستخدام وقاء الاستخلاص Elution Buffer.

### 3.1.2.5. التحقق من الـ DNA المستخلص :Checking Eluted DNA

تم التحقق من سلامة الـ DNA المستخلص بترجيل 10مك من العينة المستخلصة بعد مزجه مع 2 مك من محلول صبغة التحميل loading dye، المستخدمة لتسهيل تحميل العينة على آبار الهلامية.

تحضر هلامة الآغاروز بتركيز 0.7% بحل 0.35 غ من الآغاروز في 50 مل من وقاء تريس أسينات إيديتا (50X TAE buffer) بعد تمديده بالماء ثنائي التقطير منزوع الشوارد لتقليل ناقلية الوسط ليصبح بتركيز 1 X، يسخن المزيج حتى يذوب الهلام بشكل كامل ويصبح المحلول رائق ثم يضاف للمحلول صبغة بروميد الإيثيديوم بتركيز 5مكغ/مل عندما تصبح حرارة المحلول 60 C°، يصب الآغاروز في حوض الرحلان الأ فقي بهدوء لضمان عدم تشكل فقاعات ويترك ليبرد ثم يغمر بوقاء 1X TAE buffer، تحمل بعد ذلك العينة على آبار الهلامية إضافة إلى ترحيل سلم الـ DNA ladder 1Kb و الذي تتراوح أطوال قطعه من 250-10000 bp إلى جانب العينات المستخلصة للمقارنة و التأكد من الوزن الجزيئي للـ DNA.

توصل المساري في حوض الرحلان إلى وحدة تغذية بحيث تكون المساري السالبة الشحنة عند العينة والموجبة في الطرف المقابل بسبب الشحنة السلبية للـ DNA، ويطبق فرق في الكمون 8 V/cm و يحدد الزمن بحوالي الساعة بعد تغطية حوض الرحلان لأن التيار الكهربائي يرفع من درجة الحرارة ويسبب تبخر الوقاء الموجود في حوض الرحلان، ولإظهار عصابات الـ DNA يستخدم جهاز إظهار مزود بمصباح أشعة فوق البنفسجية (ملحق 9).

### 2.2.5. تضخيم المورثات الهدف

مواد خاصة بالبيولوجيا الجزيئية Molecular biology grades:

تتصف بأنها معدة خصيصاً للاستعمال في مجال البيولوجيا الجزيئية (molecular biology grade)، والتي قامت الشركة المنتجة بتعقيمها و تخريب الأنزيمات الحالة للحموض النووية nuclease.

- ماء PCR (PCR-water):

وهو ماء خالي من النكلياز المخرب للحموض ، يعد ضرورياً لحل البودائ المجفدة، ولإكمال حجم التفاعل في عملية الـ PCR .

(Nuclease free water, PCR grade; Fermentas, Lithuania)

- بودائ Primers:

تصمم بحسب المورثة المستهدفة. (تم استخدام بودائ لخمس مورثات، أي خمس بودائ أمامية Forward، وخمس بودائ عكسية Reverse، يعد التركيز المثالي للبودائ هو  $(0.1-1 \mu\text{M})$ ، إذ أن استخدام التراكيز المنخفضة للبودائ ينتج عنها قلة رواتج التضخيم ، كما أن التراكيز المرتفعة تتسبب في تشكيل ثنائية البودائ primer dimer.

(Custom Primers; VBC-Biotech, Austria).

- نكليوتيدات Nucleotides:

يجب استخدام تراكيز من مزيج النكليوتيدات (A, T, C, G) وهي مزيج من النكليوتيدات الأربعة الرئيسية لكل نكليوتيد بنسب متساوية، وتجدر الإشارة إلى أنه يجب استخدام أقل كمية ممكنة من  $(50-200 \mu\text{M})$  حوالي تراكيز النكليوتيدات للتقليل من أخطاء أنزيم البوليميراز .

(dNTP Mix, 10 mM; Fermentas, Lithuania).

- أنزيم نسخ الـ Taq DNA polymerase:

و هو الأنزيم الضروري لعملية تضاعف الـ DNA، حيث يقوم بإضافة النكليوتيدات إلى القطعة المضخمة، وتعتمد كمية البوليميراز المضافة على عدد الدورات في تفاعل الـ PCR ، و زمن الانفصال في الدورة الواحدة، إذ يبلغ العمر النصفى لأنزيم البوليميراز في درجة حرارة  $94 \text{ C}^\circ$  حوالي 40 دقيقة، وبالتالي يتخرب جزء من الأنزيم مع كل دورة في مرحلة الانفصال denaturation. يؤدي استخدام تراكيز مرتفعة من أنزيم البوليميراز إلى زيادة احتمال تضخيم نواتج ثانوية، و أخطاء في أنزيم البوليميراز، وقد تم استخدام أنزيم Truestart polymerase، وهو أنزيم معدل كيميائياً عن أنزيم Taq polymerase التقليدي، استخدم ليزيد الحساسية والنوعية لنواتج عملية التضخيم، إذ أنه عند استخدام هذا الأنزيم لا يبدأ تفاعل الـ PCR في درجة حرارة الغرفة، مما ينقص احتمال تشكل نواتج ثانوية.

(TrueStart™ Taq DNA Polymerase, 200 u (5 u/μl); Fermentas, Lithuania)

- كلوريد المغنيزيوم Magnesium chloride:

تلعب شوارد المغنيزيوم  $\text{Mg}^{+2}$  دور تم يم أنزيم لـ Taq DNA polymerase، حيث يحتاج هذا الأنزيم أدنى تركيز من كلوريد المغنيزيوم الحر غير المرتبط أي حوالي  $1.2-1.3 \text{ mM}$  للفعالية القصوى، كما يجب

التنويه إلى أن التراكيز المنخفضة من شوارد المغنيزيوم تؤدي إلى انخفاض في كفاءة التفاعل، بينما تتسبب الزيادة في تراكيزها إلى خفض درجة إنصهار البوادي، ويزيد من ارتباطها غير النوعي على ال DNA، كما يزيد احتمال تشكل ثنائية البوادي primer dimer، ويزيد من أخطاء في أنزيم البوليميراز في ضم النكليوتيدات الصحيحة بشكل ملحوظ.

(magnesium chloride solution 25mM، PCR grade; Fermentas، Lithuania).

- الوقاء الخاص بتفاعل ال PCR Buffer :PCR

وهو وقاء يحوي على تريس حمض كلور الماء بتركيز 100 mM، و كلوريد البوتاسيوم بتركيز 500 mM، ودرجة حموضته PH=8، وهو ضروري للحفاظ على درجة حموضة معينة لمحلول التضخيم.

(PCR Buffer 10X; PCR grade، Fermentas، Lithuania)

الDNA الهدف :

وهو المحلول الناتج عن الاستخلاص بالكيت، و يجب استخدام تراكيز ضئيلة من ال DNA أثناء تفاعل ال PCR بما يعادل 1-1000 ng لكل تفاعل لأن استخدام تراكيز مرتفعة يمكن أن تؤدي لظهور نواتج ثانوية.

الأجهزة المستخدمة:

- جهاز مدور حراري عادي Thermal Cycler لإجراء تفاعل ال PCR:

(MasterCycler® Thermal Cycler; Eppendorf mastercycler ,Germany)

- جهاز مدور حراري متدرج gradient لإجراء تفاعل ال PCR :

(TaKaRa Gradient PCR، Japan)

- ماصات أحادية أو ثمانية (8-Channel Pipettes) بأحجام مختلفة 10، 20، 100، 200، 1000 مكل.

- أنابيب إندورف بأحجام مختلفة (أنابيب PCR بحجم 0.2 ml، وأنابيب بحجم 1.5 ml).

(Eppendorf tubes; Eppendorf، Germany)

- رؤوس ماصات ميكرونية مفلترة: بأحجام مختلفة 10، 20، 100، 200، 1000 مكل

تم استخدام الرؤوس المفلترة، حرصاً على سلامة الماصات الميكرونية المستخدمة ، لأن التلوث بحجم أصغر من 1nl من ناتج التضخيم بال PCR يعتبر كافٍ لإعطاء نتائج خاطئة، كما أن الرؤوس كانت معبأة في علب عقيمة

(Eppendorf Tips; Eppendorf، Germany).

رجاجة Vortex :Autovortex; STUART scientific,UK

### 1.2.2.5. تفاعل البوليميراز السلسلي (PCR):

في العام 1983 ابتكر العالم Kary Mullis تقنية جديدة تسمح بتضاعف تسلسل من ال DNA في أنبوب اختبار أطلق على هذه العملية مصطلح التفاعل التسلسلي البوليميرازي ( PCR )، وكان هذا من الابتكارات التي سببت ثورة حقيقية في علم البيولوجيا الجزيئية، وهي الآن من أكثر التقنيات الجزيئية استخداماً في مخابر الأبحاث، وهي تسمح بنسخ قطع من ال DNA مليار مرة خلال ساعات قليلة. تعتمد تقنية ال PCR بالأساس على تضاعف ال DNA بتوسط أحد أنزيمات البوليميراز DNA Polymerase، والذي يتطلب:

- **خيط DNA مفرد السلسلة Template**: يعمل كقالب ينسخ عليه خيط ال DNA الجديد الذي سينتسخ بدوره عدداً كبيراً من المرات.

- **بادئ Primer**: يملك مجموعة هيدروكسيلية على الموقع 3' يستخدمها الأنزيم لإضافة النكليوتيدات. يعتمد تفاعل ال PCR على استخدام شريط قصير من ال DNA يسمى قليل النكليوتيدات Oligonucleotide أو بادئ Primer، يقوم بالالتصاق بشكل نوعي في منطقة محددة من ال DNA المراد تضخيمه بحسب تسلسل نكليوتيدات البادئ، ثم يقوم أنزيم البوليميراز polymerase بضم النكليوتيدات الحرة بحسب قوانين واطسون-كريك لتزواج الأسس الأزوتية في ال DNA (الأدينين A مع الثيمين T والغوانين G مع السيتوزين C)، بحيث يتم بناء سلسلة مقابلة لسلسلة ال DNA التي يتم تضخيمها. ثم يلتصق بادئ آخر يدعى البادئ العكسي reverse primer على الجهة المقابلة لجهة إنضمام البادئ الأول الذي يدعى البادئ الأمامي forward primer ويقوم أنزيم البوليميراز polymerase بنسخ السلسلة الجديدة مما يؤدي إلى تشكيل شريط مضاعف جديد من ال DNA، حيث تتكرر العملية على هذا الشريط لإنضمام بواضع جديدة وتستمر العملية مما يؤدي إلى زيادة عدد أشرطة ال DNA الناتجة بشكل أسي حيث يمكن تضخيم عدد قليل من نسخ ال DNA إلى عدة ملايين من النسخ. يتم إجراء تفاعل PCR في جهاز خاص يسمى المدور الحراري thermocycler وفيه يتم تطبيق 3 درجات حرارية كل منها يخص مرحلة معينة ولفترات زمنية كافية [107].

ويتم تفاعل ال PCR في ثلاث مراحل:

**مرحلة التسخين Denaturing** : حيث يتم تسخين مزيج التفاعل لدرجات حرارة تتراوح بين (90-100 C°) لمدة 1-2 دقيقة و ذلك لكسر الروابط الهيدروجينية بين الأسس الأزوتية الموجودة على خيطي ال DNA المتتامين وبذلك ينتج لدينا قالب DNA جاهز للتفاعل.

**مرحلة الالتصاق أو التلدين Annealing:** يتم فيها انضمام البادئات إلى أماكنها المقابلة على سلسلة الـ DNA المراد تضخيمها، وذلك بخفض درجة الحرارة إلى درجة حرارة تتناسب مع درجة انصهار البادئ  $T_m$  تكون عادة ضمن المجال  $45-65\text{ C}^\circ$  لمدة دقيقة أو أقل.

**مرحلة الامتداد أو الاستطالة Extension:** يتم فيها ضم النكليوتيدات الحرة إلى سلسلة الـ DNA المتشكلة حيث تطبق في هذه المرحلة درجة الحرارة  $72\text{ C}^\circ$  وهي الدرجة المناسبة لعمل أنزيم Taq polymerase، يختلف زمن هذه المرحلة تبعاً لطول القطعة المضخمة وسرعة عمل أنزيم البوليميراز، فمن أجل أنزيم Taq polymerase الذي يعتبر الأنزيم الأكثر استخداماً يبلغ زمن هذه المرحلة دقيقة واحدة لكل طول قدره 1000 bp.

بعد نهاية عدد الدورات المحددة تبدأ مرحلة مشابهة للمراحل الأخرى السابقة وتسمى مرحلة الاستطالة النهائية final extension وتطبق لفترة أطول من 5-10 دقائق والغرض منها ضمان إكمال ضم النكليوتيدات للعدد الهائل المتشكل من القطع الذي قد يفوق قدرة أنزيم البوليميراز أثناء عمليات التناوب السريعة نسبياً بين درجات الحرارة الثلاث.

تتوقف الزيادة الأسية لكمية الـ DNA المضخم بعد عدد محدود من الدورات يتراوح غالباً من 20-30 دورة بحسب كمية الـ DNA الموجودة في بداية التفاعل. حيث يدخل التفاعل في مرحلة تزداد فيها كمية ناتج الـ PCR بشكل أقرب إلى الخطي ثم يتوقف التضخيم بشكل كامل أو شبه كامل بسبب استهلاك مكونات التفاعل ومنافسة ناتج التضخيم للبادئات وتدعى هذه المرحلة بمرحلة الإستقرار [108] Plateau، ويبين الجدول (2) مكونات تفاعل الـ PCR والتراكيز المستخدمة عموماً.

ملاحظة: عندما يتم مزج مكونات تفاعل الـ PCR في درجة حرارة الغرفة (أقل من درجة حرارة تليدين البلديء) فمن الممكن أن ترتبط إلى بربيمات غير محددة وتتشكل بعض النواتج، قد تتضاعف هذه النواتج فيما بعد في الـ PCR مؤدية إلى تشكل نواتج PCR ثانوية [109]

جدول (2) : مكونات تفاعل الـ PCR

المكون	التركيز / الكمية المستخدمة	الوظيفة
Taq polymerase (5U/μl)	0.2-2 units	ضم النكليوتيدات الحرة لبناء سلاسل DNA جديدة.
Mgcl <sub>2</sub> 25mM	0.5-5 mM	تميم أنزيمي cofactor لأنزيم البوليميراز.
dNTPs 10mM	0.2 mM	تعتبر بمثابة حجر أساس لاصطناع الـ DNA.

تحديد مكان بدء عمل أنزيم البوليميراز وتحدد القطعة المضخمة .	0.1-1 $\mu\text{M}$	fw primer 20 $\mu\text{M}$ rev primer 20 $\mu\text{M}$
تأمين وسط مناسب لعمل أنزيم البوليميراز من حيث درجة الحموضة والقوة الشاردية .	1x	Taq buffer(10X)
الهدف المراد تضخيم جزء محدد منه .	10pg-1 $\mu\text{g}$	Template DNA
إكمال حجم التفاعل .	...	dd H2O

تعتبر 1X عن تراكيز مزيج من كلوريد البوتاسيوم و Tris Hcl قدرها 50 mM 10 mM ، على الترتيب .  
ملاحظة: اعتبرنا الماء شاهد سلبي في كل عملية تضخيم

### تحضير المحاليل Solution preparation:

#### • البودئ Primers:

نحل البودئ المجفدة باستخدام الماء الخالي من النكلياز المستخدم في البيولوجيا الجزيئية بحسب الكمية الموصى بها في التعليمات المرافقة للبودئ لينتج محلول من البودئ بتركيز 100 pmol/ $\mu\text{l}$  والتي تساوي 100  $\mu\text{M}$  ، نمدد مرة ثانية للحصول على محلول عمل بتركيز 20  $\mu\text{M}$  ثم بحفظها في درجة حرارة (-20 C°).

• **الماء الخالي من النوكلياز free nuclease water:** نظراً لسهولة تلوث الماء المستخدم ب أنزيمات النكلياز الموجودة على الجلد و في الهواء والغبار تم توزيع الماء في أنابيب إيندورف سعة 2 ml وحفظها في درجة حرارة (-20 C°).

#### طريقة العمل Procedure:

تم عزل منطقة تحضير تفاعل الـ PCR عن مناطق العمل الأخرى إضافة إلى تعقيم جميع الأدوات المخبرية وأنابيب الإيندورف الخاصة بتفاعل الـ PCR في الصاد الموصل قبل إجراء التفاعل لضمان عدم وجود أي أنزيمات نكلياز تخرب التفاعل، كما تم استخدام رؤوس ماصات معقمة و مفلترة حرصاً على سلامة الماصات الميكروني من التلوث لأن التلوث بحجم أقل من 1 nl من ناتج التضخيم يعد كافٍ لحدوث أخطاء مختلفة في تفاعل الـ PCR .

تم إخراج المواد من المجمد ووضعها على حامل مبرد لأنابيب إيندورف يحافظ على درجة حرارة (+4 C°) حتى تتصهر المواد ببطء، أضيفت الكميات المذكورة في الجدول (3) باستخدام الماصة الميكرونية إلى أنبوب إيندورف سعة 0.2 ml حسب التسلسل الوارد في الجدول .

#### 1.1.2.2.5 البودئ المستخدمة Used primers:

تم تحديد البودئ من مقالات مرجعية [16, 65, 96, 97] جدول (3).

جدول (3) : البوادي المستخدمة في عملية التضخيم

حجم القطعة الناتجة (bp)	التسلسل (5'-3')	الموقع
482	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	<i>aac(6')-Ib</i> fw <i>aac(6')-Ib</i> rev
516	ATTTCTCACGCCAGGATTTG GATCGGCAAAGGTTAGGTCA	<i>qnrA</i> fw <i>qnrA</i> rev
469	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG ACGATGCCTGGTAGTTGTCC	<i>qnrB</i> fw <i>qnrB</i> rev
596	AACTGCTTGAGCCCGTAGAT GTCTACGCCATGGACCTCAC	<i>qepA</i> fw <i>qepA</i> rev
428	GCAAGTTCATTGAACAGGGT TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	<i>qnrS</i> fw <i>qnrS</i> rev

#### 2.1.2.2.5. الكميات و التراكيز Amounts and concentrations

استخدمت المواد الواردة في الجدول (4) لتفاعل الـ PCR بحيث يصبح الحجم النهائي للتفاعل 50مكل

جدول (4) : لغميات وتراكيز المواد اللازمة لتفاعل الـ PCR (المزيج الرئيسي Master Mix)

المادة	الحجم لتفاعل واحد (50) مكل	التركيز النهائي
Nuclease-free water	36.8	-
PCR buffer	5	1X
Mgcl2	3	1.5 mM
dNTPs	1	0.2 mM
Forward primer	1.5	0.6 μM
Reverse primer	1.5	0.6 μM

ng/μl 10–100	1	DNA template
1 U	0.2	Taq polymerase

أضيفت الكميات المذكورة على الجدران الداخلية لإنبوب الإيندورف، وأغلق الأنبوب بشكل محكم ووضع في مثقاة ميكرونية خاصة بأنابيب الإيندورف لثانيتين، بحيث يتم إنزال القطرات المتجمعة على الجدران، ثم مزجت المكونات بنقر الجدران الداخلية للأنبوب بالإصبع عدة مرات .

### 3.1.2.2.5 . شروط تفاعل الـ PCR :

يتم تفاعل التضخيم باستخدام جهاز *mastercycler Eppendorf* وفق شروط محددة (جدول 5) ، وبعد انتهاء التفاعل توضع أنابيب الإيندورف في المثقاة الميكرونية لمدة ثانيتين لتحضيرها للرحلان الكهربائي .

جدول (5) : الشروط اللازمة لإجراء تفاعل الـ PCR [65, 96, 97].

الطور الثالث		الطور الثاني (30 دورة)		الطور الأول		المورثة
الزمن	درجة الحرارة	درجة الحرارة	الزمن	الزمن	درجة الحرارة	
7 min	72 C°	94 C°	45 S	2 min	95 C°	<i>qnrA, qnrB, qnrS</i>
		53 C°	45 S			
		72 C°	1 min			
7 min	72 C°	94 C°	45 S	5 min	95 C°	<i>qepA, aac(6')-Ib</i>
		55 C°	45 S			
		72 C°	1 min			

**1.3.1.2.2.5 . شروط تفاعل Gradient PCR :** يتيح لنا تفاعل التضخيم المتدرج استخدام مجال واسع من درجات الحرارة في أطوار التضخيم بدلاً من درجة حرارة محددة مع تثبيت جميع شروط التفاعل الأخرى، مما يساعد على تحديد الحرارة المثلى .

لقد تم تطبيق هذا التفاعل على كل من مورثتي *qepA* و *qnrA* وضمن مجال للتلين *annealing* يتراوح بين 48-58 درجة مئوية، ضمن جهاز مدور حراري ذو خاصية تدرجية *TaKaRa Gradient PCR* وفق شروط محددة، جدول (6) .



جدول (6) : برنامج Gradient PCR لمورثتي *qepA*, *qnrA*

عدد الدورات	الزمن	الحرارة (درجة مئوية)	
1	2.00min	94	الطور الاول
30	0:45sec	94	التمسخ
	1:00min	48-58	التلدين
	1:00min	72	الاستظالة
1	7:00min	72	الطور الثالث
1	∞	4	Conservation

#### 2.2.2.5. الرحلان الكهربائي على هلامة الآغاروز Agarose gel electrophoresis:

##### • مواد الرحلان:

- هلام الآغاروز Agarose gel: تم تحضير هلام الآغاروز بتركيز 1% وهو التركيز المناسب لإجراء الرحلان الكهربائي لجميع أحجام حزم الدنا باستخدام هلام الآغاروز. (TopVision agarose<sup>TM</sup>; Fermentas, Lithuania).
- محلول بروميد الإيثيديوم Ethidium bromide solution EtBr: وهو ضروري لكشف عصابات الدنا، تركيزه 10 mg/ml. (Ethidium Bromide 10 mg/ml; Vivantis biomedical, Malaysia)
- وقاء تريس-أسيتات-أيديتا Tris-acetate EDTA: وقاء ضروري لتحضير هلامة الآغاروز، كما يستخدم كمحلول ناقل للتيار الكهربائي في حوض الرحلان [40 mM Tris HCl (pH 8.3), 2 mM acetate and 1 mM EDTA] (TAE 50X; Fermentas, Lithuania).
- سلم DNA Ladder DNA: الضروري لمعرفة أطوال قطع الدنا، وقد استخدم ثلاثة أنواع للدنا. الاول GeneRuler<sup>TM</sup>; 50bp DNA Ladder; Fermentas (50-1000bp) تدريجاته الثاني GeneRuler<sup>TM</sup>; Ultra Low Range; Fermentas (10-300bp) تدريجاته الثالث GeneRuler<sup>TM</sup>; 1Kb DNA Ladder; Fermentas (250-10000bp) تدريجاته

- صبغة للتحميل 6X DNA Loading Dye : تتألف من تريس - حمض كلور الماء 10 mM بدرجة حموضة pH=7.6، أزرق البروموفينول 0.03% bromophenol blue، سيانول الكزليلين cyan xiline 0.03%، وجليسرول 60%، وهي مادة ملونة تستخدم لتحميل ناتج الـ PCR في حوض الرحلان الكهربائي.  
(6X DNA Loading Dye; Fermentas, Lithuania).

#### الأجهزة المستخدمة:

- i. حوض ترحيل أفقي لإجراء الرحلان الكهربائي على هلامة الآغاروز الأفقية
- ii. وحدة تغذية لإجراء الرحلان الكهربائي: (PS 9009 TX; APELEX, France)
- iii. جهاز إظهار مزود بمصباح أشعة فوق البنفسجية: (NiseUV; DAIHAN SCIENTIFIC CO, Korea)
- iv. ماصات أحادية أو ثمانية (8-Channel Pipettes) بأحجام مختلفة 200،100،20،10، مكل 1000.
- v. أنابيب إيندورف بأحجام مختلفة (أنابيب PCR بحجم 0.2 ml، وأنابيب بحجم 1.5 ml).  
(Eppendorf tubes; Eppendorf, Germany)

يعد الرحلان الكهربائي وسيلة بسيطة وسريعة وحساسة للغاية ويتم استخدامها على نطاق واسع لفصل جزيئات الـ DNA و الـ RNA تبعاً للحجم (معدل رحلان الجزيئات يتناسب عكساً مع وزن ها الجزيئي)، ومن الممكن استخدام الرحلان الكهربائي للهلام لتقدير حجم غير معروف من جزيئات الحمض النووي من خلال مقارنتها مع جزيئات معروفة الحجم تدعى بالسالام الجزيئية. وبما أن جزيئات الحمض النووي DNA و RNA تملك شحنة سالبة فيجب أن يتم وضعه في الاتجاه السالب بحيث يتمكن أن يهاجر عبر الجل إلى القطب الموجب من الحقل الكهربائي، ويلعب الجل دور مصفاة يعرقل عادة حركة الجزيئات الأكبر حجماً ، ونتيجة لذلك فإن الجزيئات الصغيرة تتحرك بشكل أسرع على طول الجل بالمقارنة مع الجزيئات الأكبر وبذلك يتم فصل جزيئات مختلفة الأطوال من حيث الحجم.

### طريقة العمل:

تجرى عملية الرحلان الكهربائي على هلامة الآغاروز 1.5% (120v,45 min) مع وقاء 1x TAE، حيث يحل 10مكل من ناتج الـ PCR بعد مزجه مع 2 مكل من محلول صبغة التحميل loading dye، المستخدمة لتسهيل تحميل العينة على آبار الهلامة وإعطاء اللون للعينات مما يمكننا من رؤية المسافة التي قطعتها جزيئات الدنا.

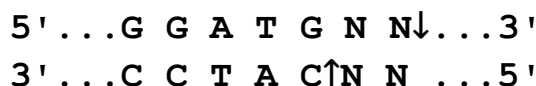
مرحلة التطهير وقراءة النتائج:

بعد إنتهاء مدة الرحلان يتم تعريض الجل لأشعة فوق بنفسجية مزود بكاميرا للتصوير وموصول مع حاسب لحفظ الصور باستخدام برنامج Alpha mini photoreader بصيغة TIFF او jpg

### 3.2.5. تحديد النمط *aac(6')-Ib-cr* عبر أنزيم الإقتطاع *BtsCI*

تميز أنزيمات الإقتطاع الداخلية endonuclease تتالياً معيناً من الدنا وتقوم بالهضم بالقرب منه، ويتم صنع أنزيمات الإقتطاع من قبل الجراثيم نفسها لتستخدمها في تفاعلات المتيلة (إضافة زمرة متيل) فيكتسب الدنا الجراثومي بنية أكثر مقاومة للإقتطاع أو الهضم من قبل آكلات الجراثيم، هذا وتصنف تلك الأنزيمات إلى ثلاثة مجموعات تختلف عن بعضها في العلاقة بين قدرتها على الإقتطاع من جهة و المتيلة من جهة أخرى، وتعد أنزيمات النمط الثاني الأكثر استخداماً في الأبحاث الجزيئية فهي ذات سياق متناظر palindromic مما يؤدي للحصول على نهايات تماسكية وتعتبر هذه الأخيرة مفيدة جداً في ربط جزيئي الدنا [110].

تم استخدام أنزيم الإقتطاع *BtsCI* (*BseGI*) والذي يميز تسلسل النكليوتيدات GGATGNN (شكل 17) في النمط الطبيعي من مورثات *aac(6')-Ib*، أما النمط الطافر cr variant فلا يمتلك هذا التسلسل، وبالتالي فإن تهضيم المورثة *aac(6')-Ib* إلى قطعتين يدل على أنها من النمط الطبيعي، أما عدم تهضيمها يشير إلى أنها من النمط الطافر /-cr/ [96].



شكل (17) : تسلسلات التعرف لأنزيم الإقتطاع *BtsCI*

(N = G, A, T or C.)

### طريقة العمل:

بعد الحصول على النتائج الإيجابية لتضخيم المورثة *aac(6')-Ib* وفق الشروط المذكورة سابقاً (جدول 7)، نتمزج المكونات وفق تعليمات الشركة المصنعة للأنزيم (جدول 8)، والذي يؤمن وسط تهضيم مناسب من حيث درجة الحموضة والقوة الشاردية مع الحرص على بقاء كل من ناتج التضخيم والأ أنزيم على الثلج أو الحامل المبرد، ثم يتم الحضن فيما بعد في درجة حرارة 55°C لمدة 4 ساعات ويليه تثبيط الأنزيم برفع الحرارة إلى 80 C لمدة 20 دقيقة في جهاز المدور الحراري، في النهاية ترحل العينات الخاضعة للتهضيم لتحديد الطفرة.

جدول (7) : الحجم المستخدمة لاجراء تفاعل التهضيم

المادة المضافة	الحجم (مكل)
محلول ناتج التضخيم	10
ماء خالي من النوكلياز	18
وقاء 10X	2
أنزيم الاقترطاع	1(10u/μl)

### 3.5. التحليل الإحصائي Statistical analysis:

استخدم البرنامج الإحصائي (SPSS Inc. Chicago Statistical Package for the Social Sciences)، (USA الاصدار /19/ لتحليل البيانات، حيث تم تحليل النتائج عن طريق الارتباط الخطي، واعتبرت قيمة  $P$  ذات أهمية إحصائية إذا كانت أقل من 0.05.

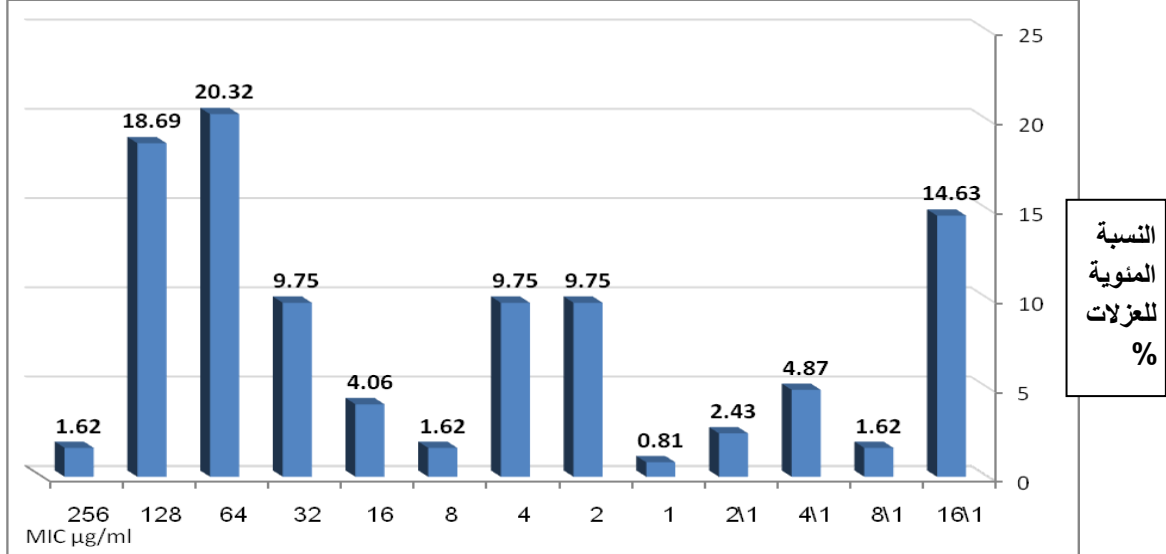
## 6. النتائج Results:

### 1.6. نتائج اختبار التحسس الجرثومي للسيبروفلوكساسين Antimicrobial susceptibility test (تحديد المقاومة من الناحية الظاهرية Phenotype):

تم إجراء اختبار التحسس الجرثومي للعزلات الجرثومية بطريقة التمديد على وسط مولر- هينتون، وأخذت العزلات قيم MIC مختلفة امتدت من (1/16 حتى 256) مكغ/مل (جدول 8، شكل 18).

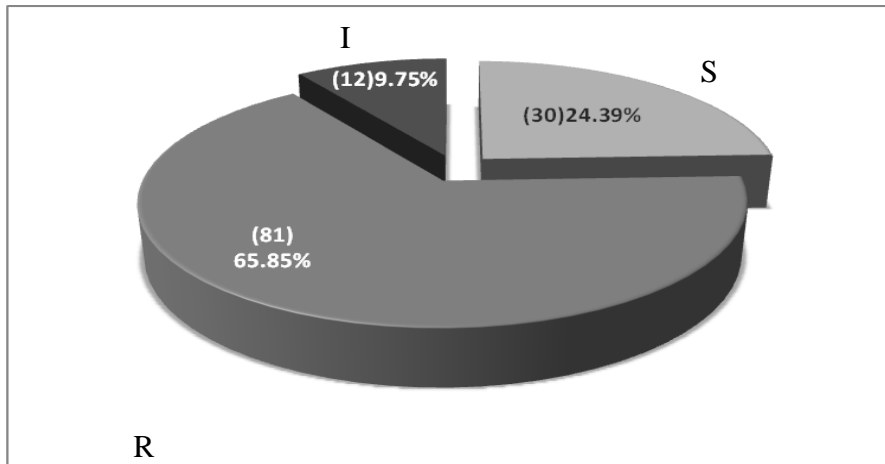
جدول (8): العزلات الجرثومية وقيم MIC الموافقة لها

النمط الشكلي للمقاومة	MIC مكغ/مل	النسب المئوية للعزلات %	عدد العزلات
	1/16	14.63	18
حساسة MIC≤1	1/8	1.62	2
	1/4	4.87	6
	1/2	2.43	3
	1	0.81	1
متوسطة الحساسية MIC=2	2	9.75	12
مقاومة MIC≥4	4	9.75	12
	8	1.62	2
	16	4.06	5
	32	9.75	12
	64	20.32	25
	128	18.69	23
	256	1.62	2



الشكل (18): النسب المئوية للعزلات الجرثومية وقيم MIC الموافقة لها

ويعين الشكل (19) نسب توزع المقاومة على العزلات المدروسة

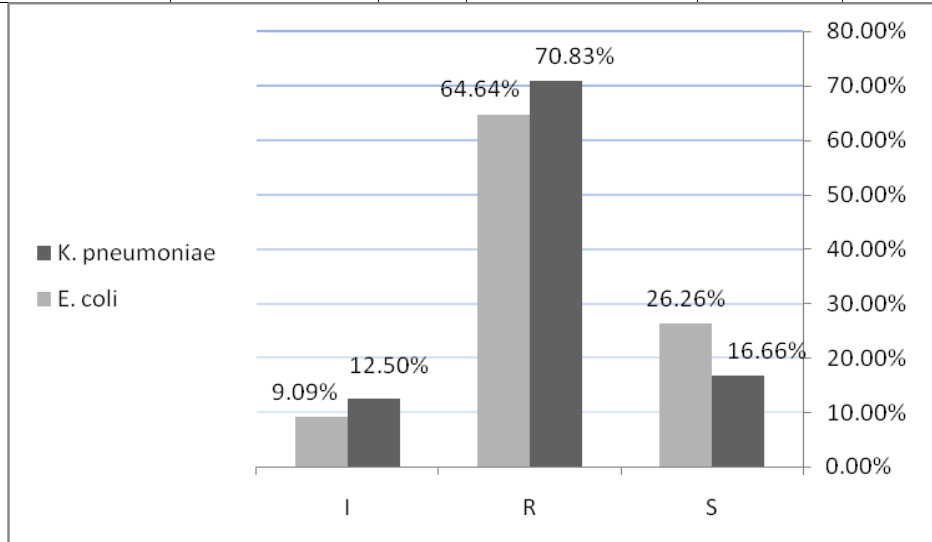


الشكل (19) : نسب الحساسية والمقاومة للعزلات الجرثومية تجاه السيروفلوكساسين: R : مقاومة، ا: متوسط الحساسية، S: حساسة

وعند إجراء مقارنة في الحساسية تجاه السيروفلوكساسين عند كلا النوعين المدروسين (جدول 9)، نلاحظ أن نسبة المقاومة عند الكليسييلة (70.83%) كانت أكبر منها في الإشريكية (64.64%) (شكل 20)،

جدول (9) : العزلات المقاومة والحساسة لكلا النوعين الجرثوميين

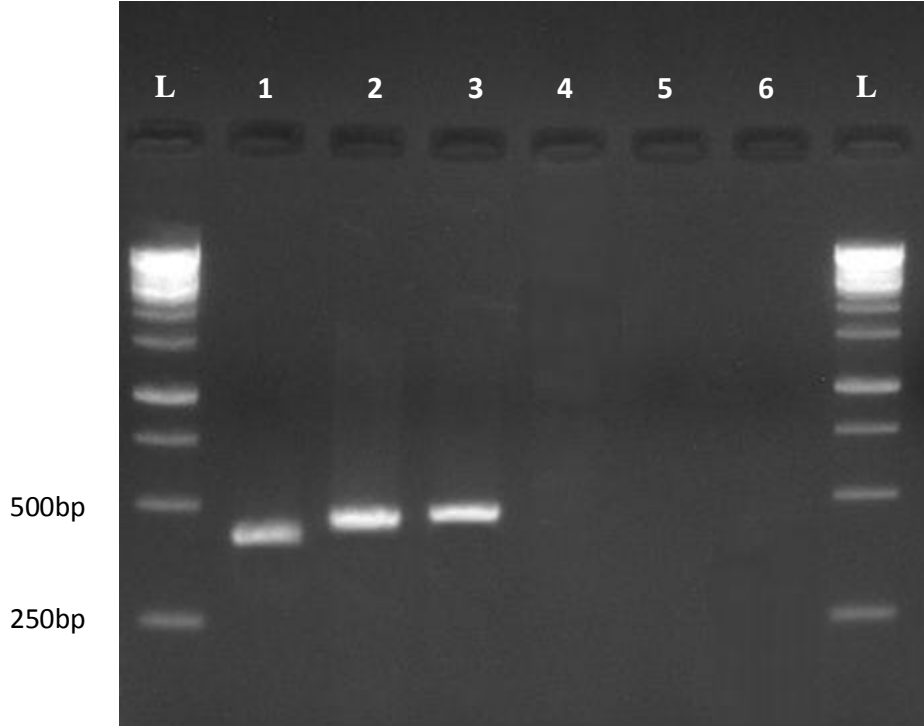
	الإشريكية القولونية		الكليسييلة الرئوية		المجموع
	مقاومة R	حساسة S	مقاومة R	حساسة S	
مقاومة R	64 (64.64%)		17 (70.83%)		81
حساسة S		26 (26.26%)		4 (16.66%)	30
متوسطة المقاومة ا	9 (9.09%)		3 (12.5%)		12
المجموع	99	100%	24	100%	123



الشكل (20) : نسب الحساسية والمقاومة للسيروفلوكساسين عند الإشريكية القولونية والكليسييلة الرئوية

## 2.6. دراسة انتشار مورثات المقاومة للكينولونات (تحديد النمط المورثي للمقاومة Genotype)

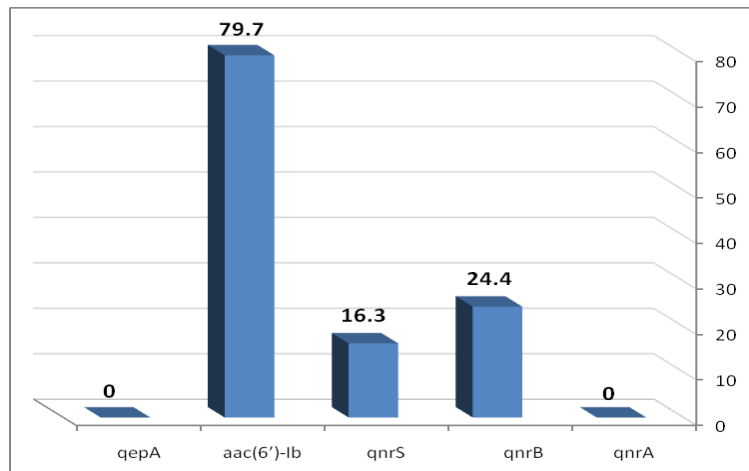
تم تضخيم المورثات بواسطة مدور حراري eppendorf mastercycler وفق شروط التفاعل المذكورة سابقاً (جدول 5) ، ويبين الشكل (21) نتائج رحلان PMQR.



شكل (21) : نتائج تضخيم مورثات PMQR

L: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; 1: *qnrS* (428bp); 2: *qnrB* (469bp); 3: *aac(6')-Ib*(482bp); 4: *qnrA*(516 bp); 5:*qepA*(596bp); 6: negative control

نتج لدينا 103 عزلات تمتلك إحدى مورثات PMQR (*qnrB* 30 ، *qnrS* 20 ، *aac(6')-Ib* 93 و كانت *aac(6')-Ib* الأكثر انتشاراً (79.7%)، كما لوحظ غياب مورثتي *qnrA* و *qepA* شكل (22).



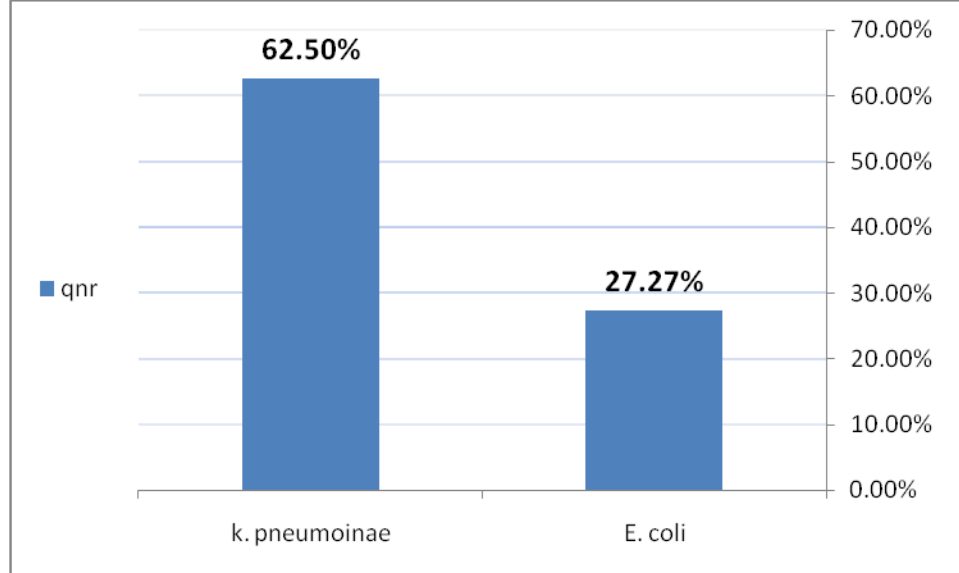
شكل(22) : النسب المئوية لمورثات PMQR في دراستنا الحالية

## 1.2.6 . مورثات *qnr*

بلغ عدد العزلات التي تمتلك مورثات *qnr* (*qnrA* او *qnrB* او *qnrS*) 123/42، بينما كانت 8 عزلات تحمل أكثر من مورثة (جدول 10).

جدول(10): توزع مورثات *qnr* ضمن العزلات الجرثومية

المورثة	الإشريكية القولونية	الكليسييلة الرئوية	مجموع العزلات
<i>qnr</i>	27/99(27.27%)	15/24(62.50%)	42/123(34.14%)
<i>qnrA</i>	0/99	0/24	0/123
<i>qnrB</i>	18/99(18.18%)	12/24(50%)	30/123(24.39%)
<i>qnrS</i>	11/99(11.11%)	9/24(37.5%)	20/123(16.26%)

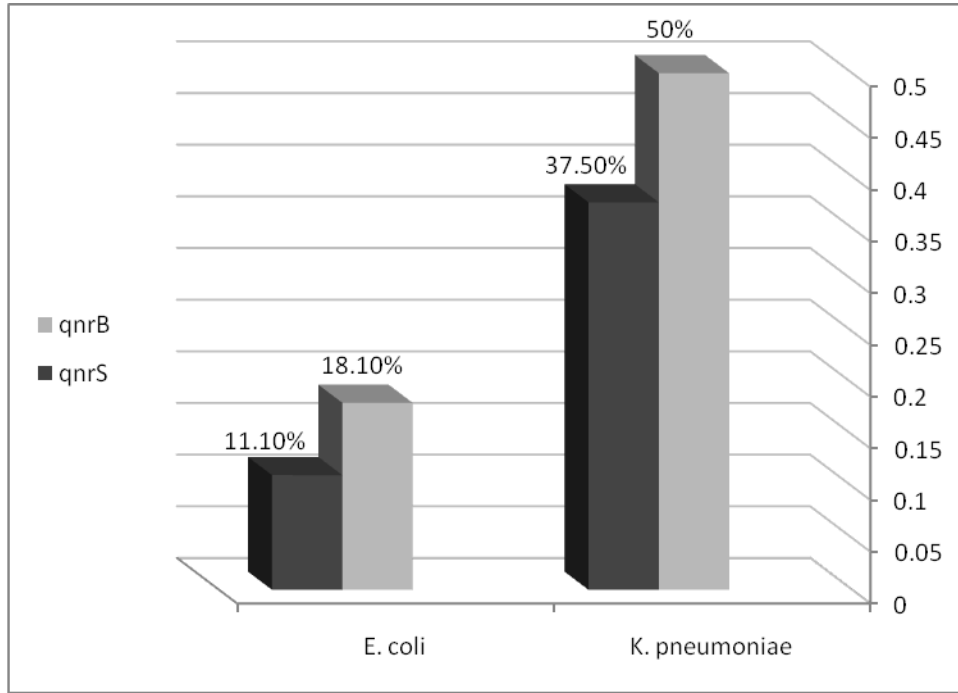


الشكل (23) : النسب المئوية لتوزع مورثة *qnr* ضمن النوعي المدروسين

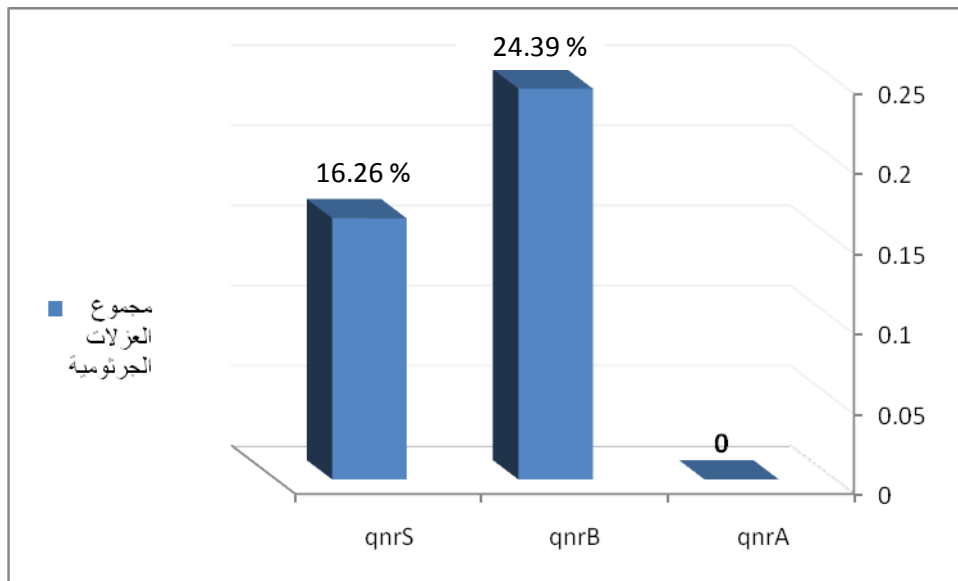
تُبدى النسب المئوية لمورثات *qnr* انتشاراً أكبر في عزلات الكليسييلة الرئوية (62.5%) منها في عزلات الإشريكية القولونية (27.27%)، (شكل 23).

وعند مقارنة توزع تلك العزلات ضمن النوعين المدروسين، نلاحظ أن *qnrB* هي المورثة الأكثر انتشاراً ضمن كلا النوعين المدروسين (شكل 24) أو حتى ضمن العزلات عموماً (شكل 25)، في حين لوحظ غياب مورثة *qnrA*.





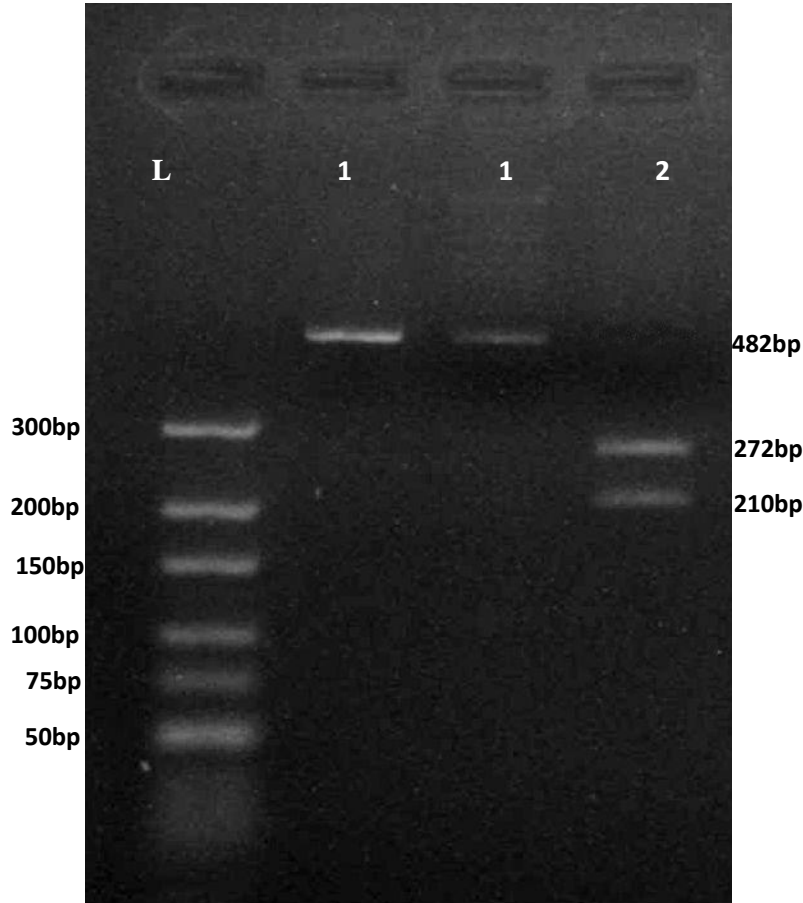
شكل (24) : توزيع مورثات (*qnrS* ، *qnrB*) ضمن النوعين المدروسين



شكل (25) : توزيع مورثات (*qnrS* ، *qnrB* ، *qnrA*) ضمن العزلات الجرثومية

## 2.2.6. دراسة انتشار النمط الطافر *aac(6')-Ib-cr* ضمن مورثة *aac(6')-Ib*:

بعد تضخيم مورثة *aac(6')-Ib* عن طريق تفاعل PCR ، خضعت نتائج التضخيم الإيجابية والبالغ عددها 98 عينة إلى أنزيم إقتطاع لتحديد النمط الطافر *aac(6')-Ib-cr* ، فالنواتج التي أنتجت قطعتين (حزمتين 272، 210 زوج أساس) تعتبر طبيعية wild type ، أما التي تعطي حزمة وحيدة (عدم وجود إقتطاع) فهي من النمط الطافر *aac(6')-Ib-cr* وذلك حسب الدراسة الكورية [65] (شكل 26).



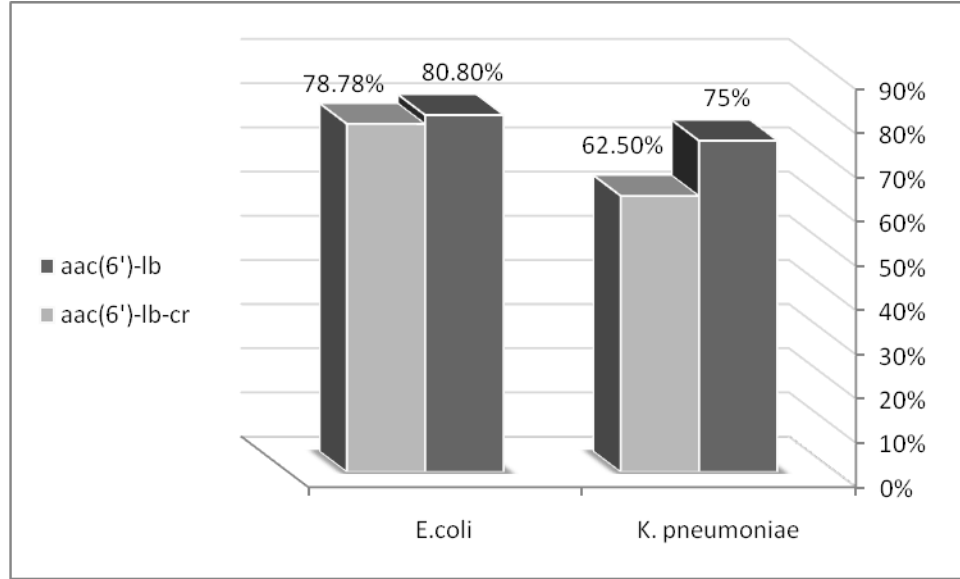
شكل (26) : تحديد النمط *aac(6')-Ib-cr* الطافر

L: GeneRuler Ultra Low range(10-300bp); 1: نمط طافر mutant ; 2: نمط طبيعي wild

أظهرت النتائج انتشار المورثة الطافرة *aac(6')-Ib-cr* بنسبة 75.6% في مجمل العزلات (جدول 11)، أما ضمن العينات الإيجابية لتضخيم *aac(6')-Ib* فقد انتشرت بنسبة 94.89% (98/93)، كما أظهرت التجارب انتشار ذلك النمط الطافر ضمن الإشريكية القولونية بشكل أكبر مما هو عليه بين الكليسييلة الرئوية (شكل 27)

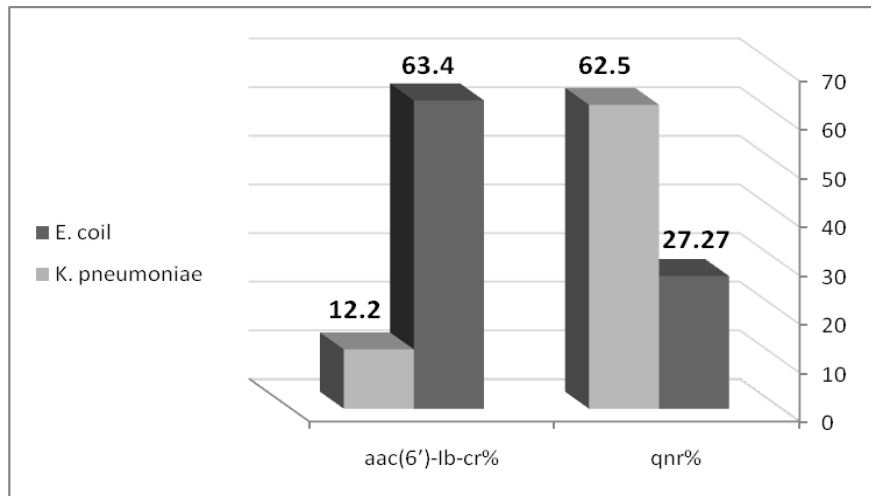
الجدول (11) : العزلات الجرثومية الحاملة لمورثات *aac(6')-lb* ، *aac(6')-lb-cr*

المورثة	الإشريكية القولونية	الكليبيسيلا الرئوية	مجموع العزلات
<i>aac(6')-lb</i>	80/99(80.8%)	18/24(75%)	98/123(79.6%)
<i>aac(6')-lb-cr</i>	78/99(78.78%)	15/24(62.5%)	93/123(75.6%)



الشكل (27) : النسب المئوية لتوزيع مورثة *aac(6')-lb* والنمط الطافر *aac(6')-lb-cr* بين النوعين المدروسين

وعلى العكس من مورثات *qnr* فقد كانت مورثة *aac(6')-lb-cr* أكثر انتشاراً بين عزلات الإشريكية القولونية منها بين الكليبيسيلا الرئوية شكل (28)



شكل (28) : النسب المئوية لانتشار المورثتين *aac(6')-lb-cr* و *qnr* ضمن النوعين المدروسين

وللتأكد من نتائج غياب كلاً من مورثتي *qepA* و *qnrA* من العزلات، تم إعادة تضخيم المورثات السابقة بإستخدام مجال واسع من درجات الحرارة في طور التلدين وفق برنامج تفاعل PCR تدرجي (جدول 7)، وكانت النتائج سلبية مما يعني غياب هاتين المورثتين .

### 3.6. دراسة العلاقة بين انتشار مورثات PMQR والمقاومة الظاهرية

لتحديد مسؤولية مورثات PMQR عن حدوث المقاومة للسيبروفلوكساسين تمت دراسة العلاقة الإحصائية التي تربط توزع تلك المورثات مع النمط الشكلي للعزلات معبراً عنها بقيم MIC . وقد أشار التحليل الإحصائي باستخدام معامل الارتباط الخطي بوجود علاقة ذات أهمية إحصائية ( $P = 0.02$ ) بين مقاومة السيبروفلوكساسين وبين توزع مورثة *aac(6')-Ib-cr* ضمن العزلات المدروسة. فقد توزعت المورثة *aac(6')-Ib-cr* ضمن العزلات المقاومة ( $MIC \leq 4$ ) بنسبة 81.48% مقارنة مع انتشارها ضمن العزلات الحساسة ( $MIC \geq 1$ ) بنسبة 66.6% (جدول 12)

جدول (12) : توزع مورثات المقاومة PMQR ضمن جميع العزلات الحساسة والمقاومة

النمط الشكلي Phenotype (n)	(n) عدد العزلات	النمط الجيني Genotype n(%)			
		<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	<i>qnr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>
Resistant (81)	<i>E. coil</i> (64)	21	14	30	66
	<i>K.pneumoniae</i> (17)				
Intermediate(12)	<i>E. coil</i> (9)	2	3	4	7
	<i>K.pneumoniae</i> (3)				
Sensitive(30)	<i>E. coil</i> (26)	7	3	8	20
	<i>K.pneumoniae</i> (4)				
	total	30	20	42	93

أما توزع مورثات *qnr* ضمن كل العزلات سواء الحساسة أو المقاومة للسيبروفلوكساسين فلم يكن ذو أهمية إحصائية ( $P = 0.09$ )، وبالتالي لم يثبت وجود علاقة بين تلك المورثات مع المقاومة الظاهرية، حيث توزعت مورثات *qnr* ضمن عزلاتنا الحساسة للسيبروفلوكساسين ( $MIC \geq 1$ ) بنسبة 26.6% مقارنة مع انتشارها ضمن العزلات المقاومة ( $MIC \leq 4$ ) بنسبة 37% (جدول 12).

من ناحية أخرى فقد تمت دراسة العلاقة بين توزع مورثة *aac(6')-Ib-cr* مع مورثات *qnr*، وتبين توزع مورثات *qnr* بنسبة (31/93) 33.33% ضمن العزلات الحاوية على *aac(6')-Ib-cr*، مقارنة مع انتشارها بنسبة مماثلة (10/35) 28.57% ضمن العزلات الغير حاوية على مورثات *aac(6')-Ib-cr* والعلاقة غير هامة إحصائياً ( $P = 0.91$ ).

#### 4.6. توزع العزلات الحاملة لمورثات PMQR ضمن قيم MIC المختلفة

توزعت قيم MIC للسيبروفلوكساسين للعزلات الحاملة لمورثات PMQR (*qnr* أو *aac(6')-Ib-cr*) ضمن عدة قيم MIC مختلفة بين 1/16 إلى 256 مكغ/مل ما بين حساسة ومقاومة جدول (13)

جدول (13) : قيم MIC للعزلات الحاملة لمورثة PMQR واحدة أو أكثر

المورثة	عدد العزلات	MIC n (%) مكغ/مل			
		1/16 – 1/2	1 – 4	8 – 32	64 – 256
<i>qnrB</i>	30	6(20)	5(16.6)	6(20)	13(43.3)
<i>qnrS</i>	20	2(10)	5(25)	1(5)	12(60)
<i>qnr</i>	42	7(16.6)	8(19)	6(14.2)	21(50)
<i>qnrB+ qnrS</i>	8	1(12.5)	2(25)	1(12.5)	4(50)
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	93	19(20.4)	16(17.2)	16(17.2)	42(45.1)
<i>qnr+ aac(6')-Ib-cr</i>	32	4(12.5)	6(18.7)	5(15.6)	17(53.1)
<i>qnrB+ aac(6')-Ib-cr</i>	23	3(13)	4(17.3)	5(21.7)	11(47.8)
<i>qnrS+ aac(6')-Ib-cr</i>	15	1(6.6)	3(20)	1(6.6)	10(66.6)
<i>qnrB+qnrS+ aac(6')-Ib-cr</i>	6	0(0)	1(16.6)	1(16.6)	4(66.6)

كما يبين الجدول (14) أن المجال (ذو قيم MIC تتراوح بين 64 – 256 مكغ/مل) والذي يمثل المقاومة العالية المستوى للسيبروفلوكساسين يضم نسبة كبيرة من مورثات PMQR ; حيث يضم 50% من العزلات التي تحمل مورثة *qnr* إضافة إلى 45.1% من العزلات الحاملة لمورثات *aac(6')-Ib-cr*.

و يتضح وجود بعض العزلات التي تحمل أكثر من مورثة من نوع PMQR حيث نجد 8 عزلات تحمل مورثتي  $qnrB+qnrS$  (6.5%) ، و 32 عزلة (26.01%) تحمل كلا من  $qnr+ aac(6')-Ib-cr$  إضافة إلى 6 عزلات تحمل  $qnrB+qnrS+ aac(6')-Ib-cr$  (4.8%).

#### 5.6. التحري عن مورثات $qnr$ ضمن الصبغي:

أظهرت النتائج السابقة (جدول 10) وجود 81 عزلة جرثومية خالية من مورثات  $qnr$ ، ولتفسير النتائج تم اختيار 43 عزلة منها بشكل عشوائي للتحري عن تلك المورثات ( $qnr$ ) على صبغيات العزلات الجرثومية وباستخدام نفس الشروط السابقة لتفاعل الـ PCR (جدول 5).

جدول (14): توزع مورثات  $qnr$  على صبغيات 43 عزلة منتقاة عشوائياً

النمط الشكلي Phenotype (n)	(n) عدد العزلات	النمط الجيني Genotype n(%)		
		<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	<i>qnr</i>
Resistant (30)	<i>E. coil</i> (25)	10	10	18
	<i>K.pneumoniae</i> (5)	2	3	4
Intermediate(5)	<i>E. coil</i> (4)	1	0	1
	<i>K.pneumoniae</i> (1)	1	1	1
Sensitive(8)	<i>E. coil</i> (7)	5	2	5
	<i>K.pneumoniae</i> (1)	0	0	0
	total	19	16	29

ويعتبر من الجدول (14) أن عدد العزلات 43 (7 كليبسيلا رئوية و 36 إشريكية قولونية)، منها 18.6% حساسة (8/43) و 11.6% متوسطة المقاومة (5/43) ، و 69.7% مقاومة (30/43)، كما يبين الجدول توزع مورثات  $qnr, qnrS, qnrB$  بنسبة 44.1% (19/43)، 37.2% (16/43)، 67.4% (29/43) على التوالي. وعند دراسة الارتباط الخطي بين توزع مورثات  $qnr$  (المحمولة على الصبغي) مع النمط الشكلي لمقاومة السيبروفلوكساسين كانت العلاقة هامة إحصائياً ( $P=0.05$ ).

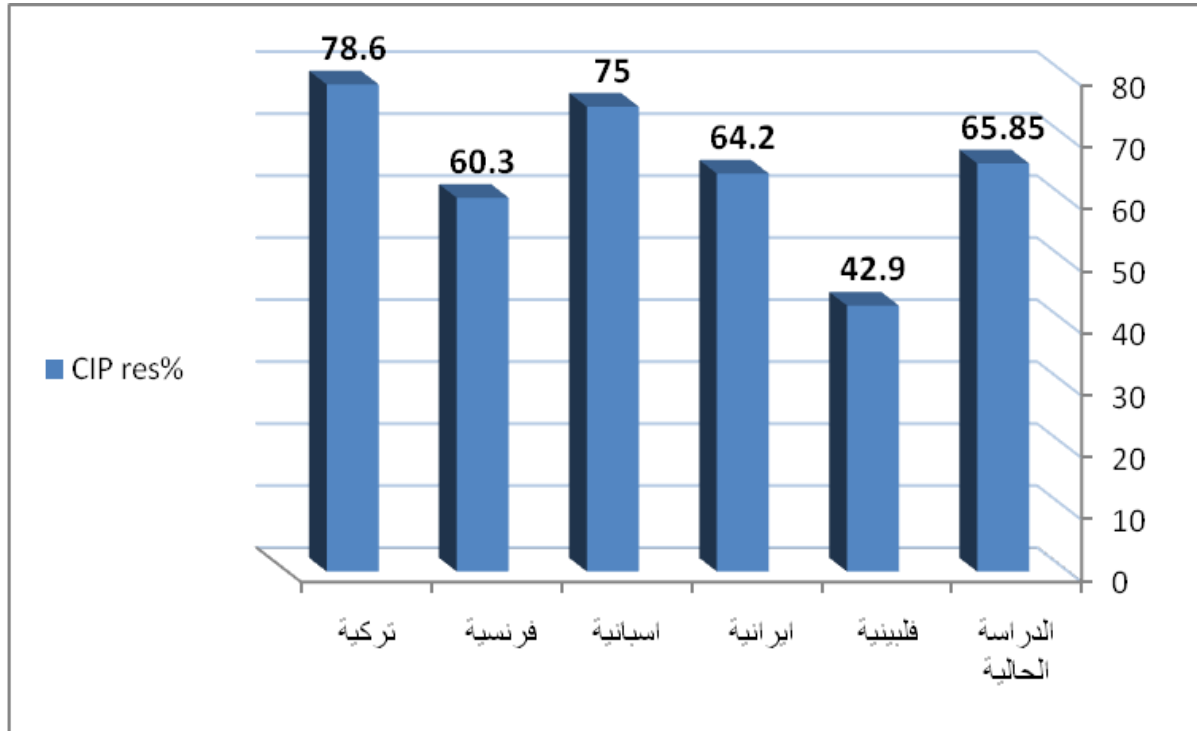
## 7. المناقشة:

يمكن أن تحدث المقاومة للصاد الحيوي بأربع طرق رئيسية: حماية المركب أو الموقع الهدف للصاد الحيوي، تغيير بنية الهدف، إنقاص تراكم الصاد، تعديل الصاد أنزيمياً [111]، وتستطيع الأمعاثيات أن تقاوم الكينولونات بكل الطرق السابقة، أما عبر مورثات طافرة محمولة على الصبغي تشمل (تغيير بنية الهدف، إنقاص تراكم الصاد)، أو عن طريق مورثات محمولة على ال بلازميد PMQR والتي تشمل على (حماية المركب الهدف *qnr*، إنقاص تراكم الدواء *qepA* و تعديل الصاد أنزيمياً *Ib-cr*-(*aac(6')*).

وعلى الرغم من الدور الكبير الذي لعبته الطفرات الصبغية في مقاومة الكينولونات والتي تؤثر بشكل رئيسي على نقل المقاومة بشكل عمودي فقط (Vertical Gene Transfer) VGT حيث تنتقل فيه مورثات المقاومة من الخلية الأم إلى الخليتين الناتجتين عن الإقسام)، إلا أن آليات المقاومة تجاوزت حدود الصبغيات و أصبحت محمولة على البلازميد (مسؤول عن الانتشار الأفقي HGT) الذي يسهل من الانتشار السريع لمورثات المقاومة بين الأنواع الجرثومية المختلفة إضافة إلى نقل عدة مورثات مقاومة دفعة واحدة [112]. لذا كان الهدف من البحث التحري عن تلك المورثات المحمولة على البلازميد وتحديد دورها في حدوث المقاومة من النمط الظاهري phenotype .

### 1.7. مقاومة السيبروفلوكساسين من الناحية الظاهرية

بلغت نسبة العزلات المقاومة للسيبروفلوكساسين 65.85% (123/81) وتمثل العزلات التي تمتلك  $MIC \leq 4$  مكغ/مل، وليس من المستبعد الحصول على تلك النسبة العالية بإعتبار أن العزلات الجرثومية منتجة لأنزيمات ESBL [82]، وعند المقارنة مع الدراسات العالمية نلاحظ تقارب في نسبة الم قاومة مع الدراسة الايرانية 64.2% [113] ، بينما نلاحظ تفوقاً في نسبة المقاومة في الدراسة التركية 78.6% [114] و الإسبانية 75% [115] أما النسب الأخفض فكانت عند كل من الدراساتين الفرنسية 60.3% [116]، والفلبينية 42.9% [117] شكل (29)



شكل (29) : مقارنة للنسب المئوية لمقاومة الجراثيم السيبروفلوكساسين مع الدراسات العالمية

وبشكل عام يعزى ارتفاع نسبة المقاومة للسيبروفلوكساسين في دراستنا والدراسات في المناطق الجغرافية القريبة أو تلك التي تتشابه في درجة وعي مجتمعاتها الصحي مع مجتمعنا إلى الاستخدام العشوائي لتلك الزمرة من الصادات الحيوية الناتج عن نقص الوعي والثقافة الصحية، حيث يتم تعاطي الأدوية بدون وصفات طبية وبدون العودة للطبيب أو عدم الالتزام بفترة العلاج المحددة والجرعة اللازمة، الأمر الذي يؤدي لبقاء بعض الجراثيم المقاومة للصاد المستخدم ومن ثم انتشارها في المجتمع . يضاف إلى ذلك لجوء الأطباء في الدول النامية إلى الوصف العشوائي دون الإعتدال على نتيجة التحليل المخبري نظراً للتكلفة المرتفعة والوقت الطويل اللازم لإجرائه، حيث يشجع إجراء التغطية العشوائية لمرضى وهذا ما سبب انتشار الذراري الجرثومية الشديدة المقاومة للكينولونات ، أما في الدول المتطورة فيلاحظ انخفاض نسب المقاومة بشكل عام بسبب الترشيح الكبير لاستخدام الصادات الحيوية و الوعي الصحي المنتشر بين أفرادها .

## 2.7. انتشار مورثات PMQR

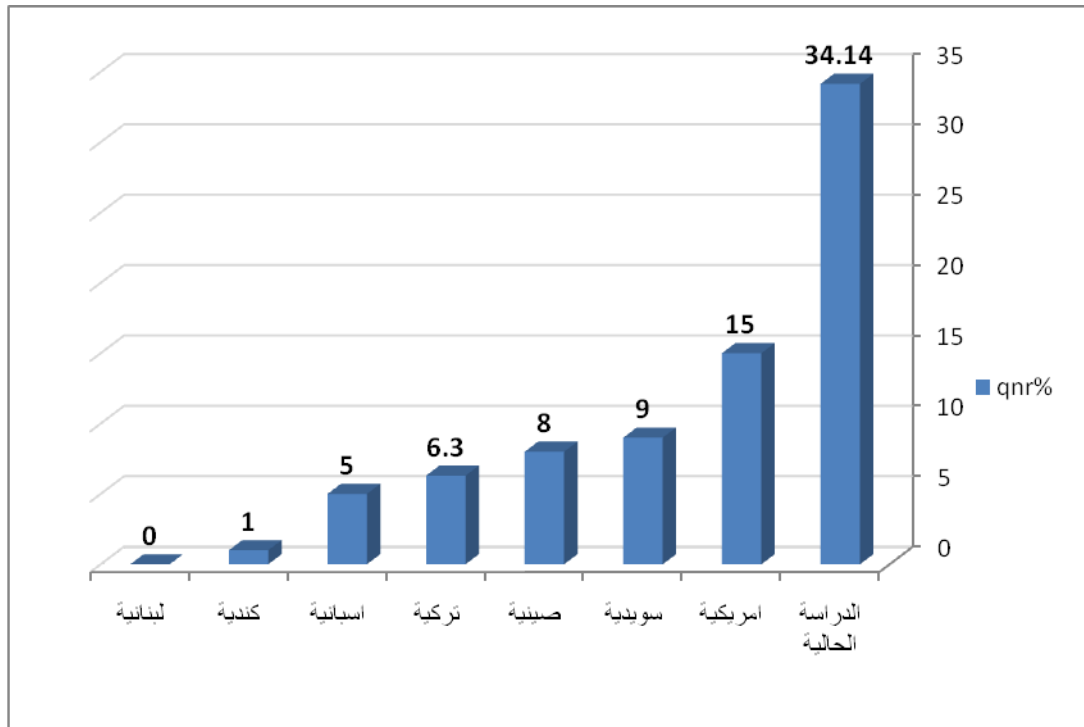
غالباً ما تعتبر الطفرات الصبغية في مورثات أنزيمات الجيراز والتوبوايزوميراز هي المسؤولة عن المقاومة، أما حديثاً فقد اكتشفت مورثات محمولة على البلازميد PMQR (*qnr, aac(6')-lb-cr, qepA*) والتي تشارك في المقاومة إلى جانب المقاومة الصبغية [4]. يمكن تفسير الانتشار الكبير لمورثات PMQR في الدراسة الحالية إلى وجودها محمولة على بلازميد يسهل من انتقالها بين الأنواع المختلفة وضمن النوع الواحد، حيث تنتقل



مجتمعة بشكل شرائط وراثية Gene Cassette عبر الهنقولات Transposones أو الإنتغرونات Integrons ذات القدرة على نقل وغرز مجموعة من المورثات المقاومة للصادات في أماكن مختلفة من المادة الوراثية ، مما يجعل الجراثيم مقاومة لزمير مختلفة من الصادات الحيوية [31].

### 1.2.7. انتشار مورثات *qnr*

أبدت الدراسة نسب مرتفعة من مورثات *qnr* 123/42 (34.14%) بإعتبارالعزلات المدروسة منتجة لأنزيمات ESBL [45, 92, 118]، وبالمقارنة مع الدراسات العالمية الأخرى تبين أن تلك المورثة كانت غائبة في دراسة لبنانية [119]، وبلغت النسبة 1% في الدراسة الكندية [98]، 5% في الدراسة الاسبانية [120] ، كما بلغت نسب أعلى في مناطق جغرافية أخرى من العالم، فقد وصلت إلى 6.3% في الدراسة التركية [114]، وبشكل مشابه في كل من الدراسة السويدية 9% [16] و الصينية 8% [121]، وبلغت حتى 15% في الدراسة الأمريكية [97] الشكل (30) .



الشكل (30) : النسب المئوية لمورثة *qnr* في دراسات مختلفة حول العالم

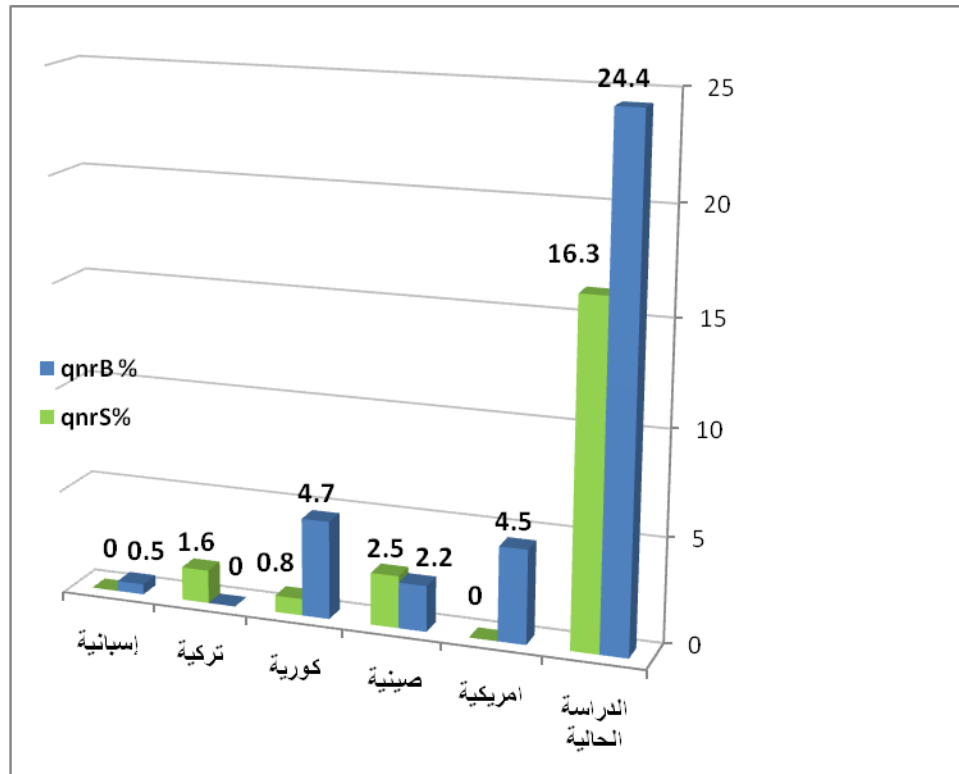
\*شملت الدراسة اللبنانية والسويدية على عزلات من الإشريكية القولونية و الكليبييلة ، شملت الكندية والاسبانية على أنواع مختلفة من الأمعائيات.

لقد اختلف توزع مورثات المقاومة *qnr* بين النوعين الجرثوميين المدروسين، فقد كانت أكثر انتشاراً في الكليبييلة الرئوية (24/15) 62.5% مما هي عليه في الإشريكية القولونية (99/27) 27.27%، وهذا يتوافق مع الدراسة الأمريكية [97]، والصينية [121]. ففي الدراسة الأمريكية مثلاً تم اكتشاف مورثات *qnr* في (47/2) 4% و

(106/21) 20% عند الإشرىكية والكليسييلة على الترتيب، وكذلك الأمر في الدراسة الصينية 5.3% للإشرىكية القولونية مقابل 16.2% للكليسييلة الرئوية.

أظهرت نتائج دراسة ثلاثة أنماط من مورثات *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*) أن مورثة *qnrB* هي الأكثر انتشاراً من الأنماط الأخرى (123/30) 24.4% وتلتها مورثة *qnrS* (123/20) 16.3% كما في الدراسات الإسبانية (65) و (*qnrB*=0.5%, *qnrS*=0%) [115] ، و الدراسة الكورية (*qnrB* = 4.7%, *qnrS*=0.8%) [65] و الأمريكية (*qnrB*=4.5%, *qnrS*=0%) [97] . من جهة أخرى نجد أن النسب معكوسة في الدراسة التركية (121) (*qnrB*=2.2%, *qnrS*=2.5%) ، ومقارنة في الدراسة الصينية (122) (*qnrB*=0%, *qnrS*=1.6%) ، و (*qnrB*=0%, *qnrS*=1.6%) [122] ، و (*qnrB*=2.2%, *qnrS*=2.5%) [121] (شكل 31).

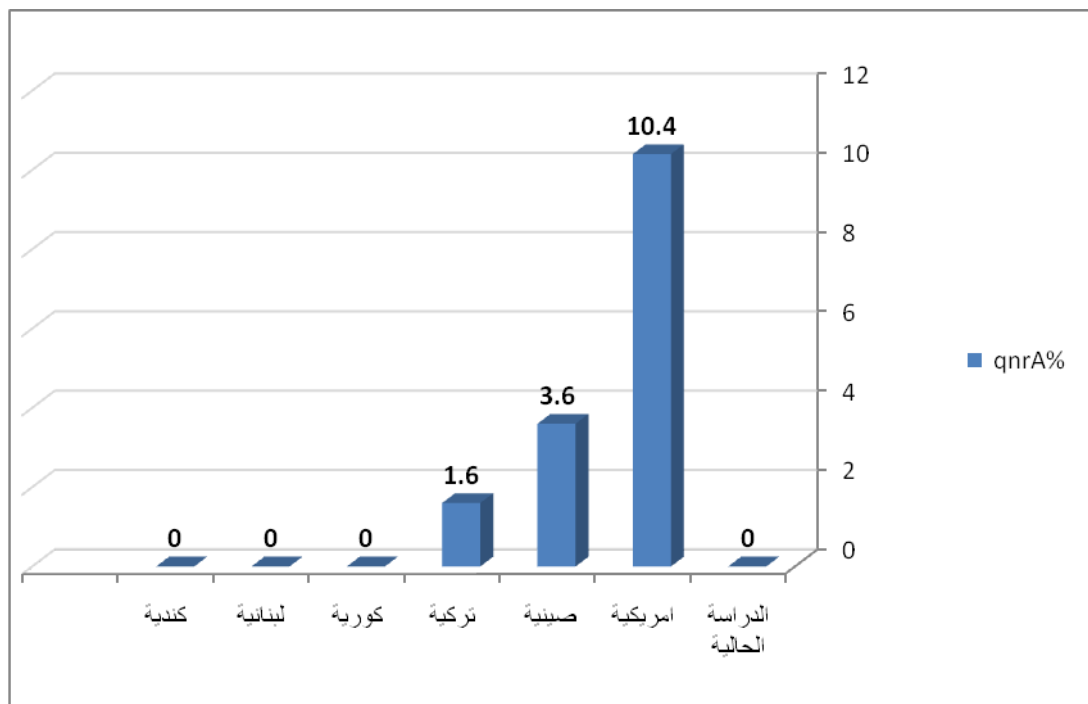
يمكن تفسير الانتشار الكبير لمورثة *qnrB* ضمن العزلات المنتجة لأنزيم ESBL بسبب ارتباط وجود *co*-*presence* مورثات *qnrB* ومورثات ESBL محمولة على نفس البلازميد كما تشير لذلك العديد من الدراسات [4, 48, 123] ، من ناحية أخرى، وبالرغم من تواجد مورثات *qnrS* ضمن عزلاتنا المنتجة لأنزيمات ESBL إلا أنها قد تكون محمولة على بلازميدات أخرى غير حاملة لأنزيمات ESBL [124, 125] ، حيث أشارت عدة دراسات إلى انتشار مورثات *qnrS* ضمن عزلات غير منتجة لأنزيمات ESBL [118, 126]



شكل (31) : النسب المئوية لكل من مورثتي *qnrB* و *qnrS* في مناطق جغرافية مختلفة

\*شملت الدراسات التركية والإسبانية على عزلات من الإشرىكية القولونية فقط، لم تحدد الدراسة الكورية إنتاج العزلات الجرثومية لأنزيمات ESBL

أما مورثة *qnrA* فكانت غير موجودة ضمن عزلتنا وهذا يتفق مع الدراسة الكورية، الكندية واللبنانية [65, 98, 119]، بالمقابل فقد كانت تلك المورثة *qnrA* الأكثر انتشاراً في دراسة أمريكية 10.4% [97] ، وفي كل من الدراسة الصينية 3.6% [121]، والتركي 1.6% [122] (شكل 32).



شكل (32) : النسب المئوية لتوزع مورثة *qnrA* حول العالم

\*شملت الدراسات التركية على عزلات من الإشريكية القولونية فقط، لم تحدد الدراسة الكورية إنتاج العزلات الجرثومية لانزيمات ESBL ، ضمت الدراسة اللبنانية على عزلات من الإشريكية القولونية والكليبيسيلا ، شملت الكندية على أنواع مختلفة من الأمعاثيات

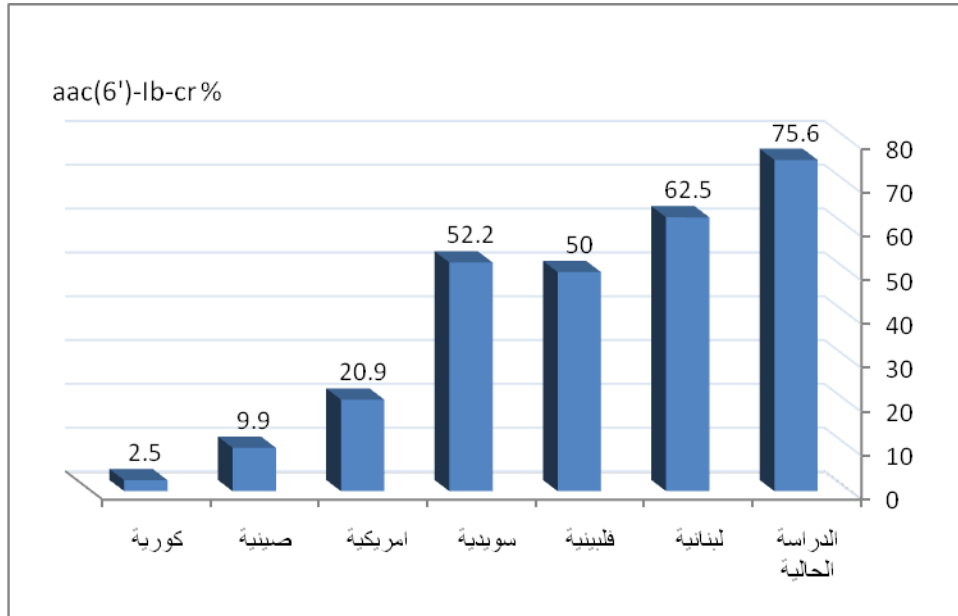
### 2.2.7. انتشار مورثات *qepA*

نلاحظ غياب مورثة *qepA* من العزلات المدروسة كما في الدراسات [16, 117]، عموماً تعتبر هذه المورثة نادرة جداً فقد اكتشفت حديثاً لأول مرة ضمن عزلات من الإشريكية القولونية في اليابان و بلجيكا [43, 127] عام 2007 ، تلاها اكتشاف آخر لعزلة وحيدة في كوريا الجنوبية ضمن الإشريكية القولونية [65]، وكانت بتركيز لا تتجاوز 1%.

### 3.2.7. انتشار الهمط الطافر *aac(6')-lb-cr* variant

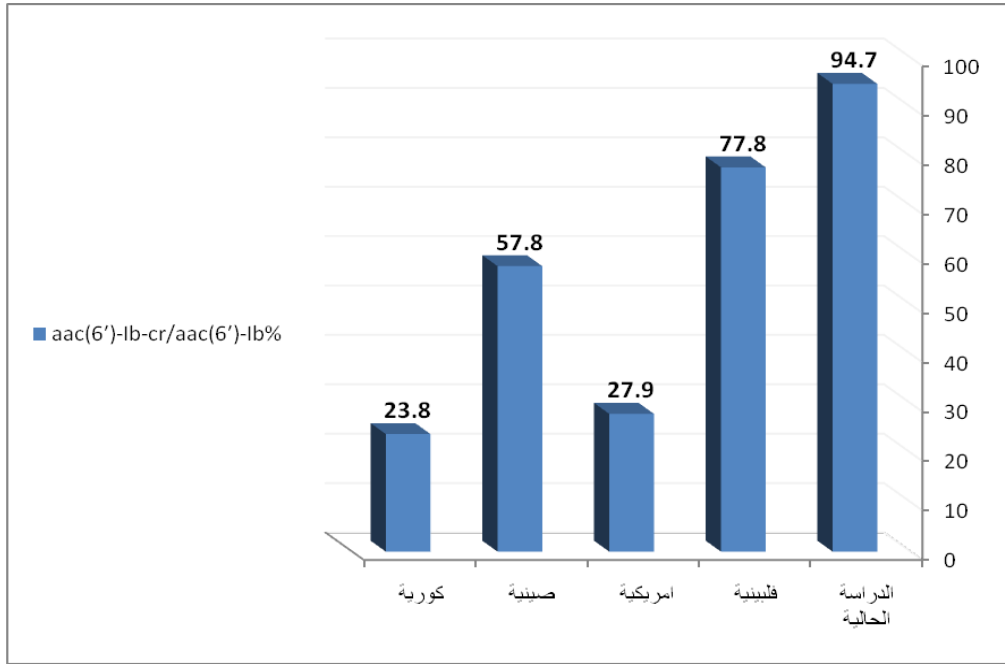
تنتشر هذه الطفرة بنسبة عالية (75.6%) ضمن عزلتنا وبنسبة تفوق مورثات *qnr*، فقد بلغ عدد العزلات الإيجابية لهذه المورثة 123/93 وتعد هذه النسبة كبيرة إذا ما قورنت مع دراسات عالمية أخرى، فقد بلغت 50% في دراسة فلبينية [117] و 20.9% في دراسة أمريكية [96]، و 52.2% في السويدية [16] ، و 9.9% في

دراسة صينية [121]، و 2.5% في الدراسة الكورية [65]، إلا أنها كانت مرتفعة في الدراسة اللبنانية 62.5% [119] شكل (33)



شكل (33): مقارنة النسب المئوية لانتشار النمط الطافر  $aac(6')-lb-cr$  في دراسات مختلفة

\* شملت الفلبينية على أنواع مختلفة من الأمعائيات ، لم تحدد الدراسة الكورية إنتاج العزلات الجرثومية لانزيمات ESBL ، ضمت الدراسة اللبنانية والسويدية على عزلات من الاشريكية القولونية و الكليسييلة .  
وقد بلغت النسبة (  $aac(6')-lb / aac(6')-lb-cr$  ) في دراستنا 94.7 % ويمثل هذا الرقم النسبة المئوية للعزلات التي تحمل النمط الطافر  $aac(6')-lb-cr$  ضمن المورثة  $aac(6')-lb$  وهي نسبة أعلى من مثيلاتها في الدراسات الفلبينية (77.8%) [117]، والامريكية (27.9%) [96]، والصينية (57.8%) [121]، والكورية (23.8%) [65]. شكل (34)



شكل (34) : مقارنة النسب المئوية  $aac(6')-lb / aac(6')-lb-cr$

\* شملت الفلبينية على أنواع مختلفة من الأمعاثلت ، لم تحدد الدراسة الكورية إنتاج العزلات الجرثومية لانزيمات ESBL وعلى العكس من مورثات  $qnr$  فقد كان النمط الطافر  $aac(6')-lb-cr$  أكثر انتشاراً بين عزلات الإشريكية القولونية (99/78) 63.4% منه بين عزلات الكليبيسيلا الرئوية (24/15) 12.2% ، وهذا يوافق كلاً من الدراسة الأمريكية والسويدية التي بلغت فيه ما نسبة النمط الطافر عند الإشريكية القولونية (31.9%، 56.7%) مقابل (16%، 28.5%) عند الكليبيسيلا الرئوية على الترتيب [96]، [16] ، و يختلف مع الدراسة الصينية والتي كانت نسبة انتشار المورثة الطافرة فيها أقل عند الإشريكية القولونية 48.8% للإشريكية منها عند الكليبيسيلا الرئوية 78.9% [121] .

ولتفسير وجود مورثة  $aac(6')-lb-cr$  بنسبة كبيرة تمت دراسة العلاقة بين توزيع المورثة السابقة مع مورثات  $qnr$  ، وتبين أن العلاقة غير هامة إحصائياً مما يشير إلى عدم الترابط بينها وانتشارها بشكل مستقل كما في الدراسة الأمريكية [96]، وعلى العكس من ذلك وحسب الدراسة الصينية، تنتشر مورثات  $aac(6')-lb-cr$  بنسبة 55.2% ضمن العزلات الحاوية على مورثات  $qnr$  مقابل 6% ضمن العزلات السلبية [121]. يمكن أن يُعزى الانتشار الكبير لمورثة  $aac(6')-lb-cr$  في العزلات المدروسة لتوزيعها ضمن عزلات منتجة لأنزيمات ESBL [4, 16, 45, 89]، حيث ترتبط المورثات السابقة مع بعضها ( $aac(6')-lb-cr$  و ESBL) وتحمل على بلازميد واحد سهل الحركة، و يؤدي الارتباط السابق لظهور مقاومة مشتركة لكلا الصادين (الكينولونات و السيفالوسبورينات) مما يقلل من الخيارات العلاجية [128].

### 3.7. العلاقة بين النمط *aac(6')-lb-cr* والمقاومة الظاهرية للسيبروفلوكساسين

دُرست العلاقة التي تربط وجود المورثة *aac(6')-lb-cr* مع نمط الحساسية للسيبروفلوكساسين ، وتبين بتحديد معامل الارتباط الخطي وجود علاقة ذات أهمية إحصائية تربط بين وجود تلك المورثة وحدوث المقاومة للسيبروفلوكساسين، ويمكن تفسير هذه العلاقة ب أن المورثة *aac(6')-lb-cr* تنتج بروتين يقوم بتعديل جزيئة السيبروفلوكساسين أنزيمياً لتصبح عديمة الفعالية عبر تفاعل أسئلة النتروجين الحر من حلقة البييرازينيل [96] . وهذا يتوافق مع دراسات أخرى كما في الدراسة الإيطالية حيث توزعت مورثة *aac(6')-lb-cr* ضمن العزلات شديدة المقاومة فقط [129]، و ترافقت المقاومة الظاهرية للسيبروفلوكساسين مع العزلات التي تحوي أحد مورثات PMQR (سواء *aac(6')-lb-cr* او *qnr*) في الدراسة الكورية [65].

### 4.7. العلاقة بين مورثات *qnr* والمقاومة الظاهرية للسيبروفلوكساسين

تمت دراسة توزع انتشار مورثات *qnrB* ، *qnrS* ضمن النوعين الجرثوميين عبر تحديد معامل الارتباط الخطي ولوحظ عدم وجود أهمية إحصائية تربط بين وجود تلك المورثات مع المقاومة ال ظاهرية حيث كانت قيم  $P$  ( 0.14 , 0.49) لكلا المورثتين على الترتيب.

وتتطابق النتيجة السابقة مع عدة دراسات أخرى تفيد ب انتشار تلك المورثات ضمن العزلات الحساسة والمقاومة للسيبروفلوكساسين [16, 116, 120, 130, 131, 132] ، ويفسر ذلك بدورها الم وهب لحدوث طفرات صبغية إضافية في أنزيم الجيراز (*gyrA*) او التوبرايزوميراز (*parC*) IV [4]، وبالتالي يمكن تفسير وجود المقاومة في العزلات المدروسة الخالية من مورثات *qnr* بوجود آلية إضافية للمقاومة على شكل طفرات صبغية في مورثات الـ *gyrA* و *parC* تعمل منفردة او بالتزامن مع وجود مورثات PMQR [5].

من جهة أخرى، ونظراً لغياب الارتباط بين توزع مورثات *qnr* على البلازميد وبين المقاومة الظاهرية للسيبروفلوكساسين ضمن العزلات المدروسة، فقد تم التحري عن تلك المورثات ضمن صبغيات بعض العزلات الجرثومية والتي يخلو بلازميدها من مورثات *qnr*. فقد توزعت مورثات *qnr* بنسبة %67.44 (29/43) ووجد علاقة تربط هذه النسبة مع المقاومة الظاهرية مما يدل على دور تلك المورثات في حدوث المقاومة، ويمكن تفسير غياب تلك المورثات من البلازميد وظهورها ضمن الصبغي ب حدوث اندماج *integration* لها ضمن الصبغي الخاص بتلك العزلات [131, 133]، ومنه فإن العزلات الجرثومية الحساسة للسيبروفلوكساسين لايعني بالضرورة عدم احتوائها على مورثات *qnr* مما يثير المخاوف من الانتشار الخفي لتلك المورثات والتي تؤهب لحدوث الطفرات في حال تعرضت لتراكيز علاجية من السيبروفلوكساسين، وبكلمة أخرى فان دور هذه المورثات

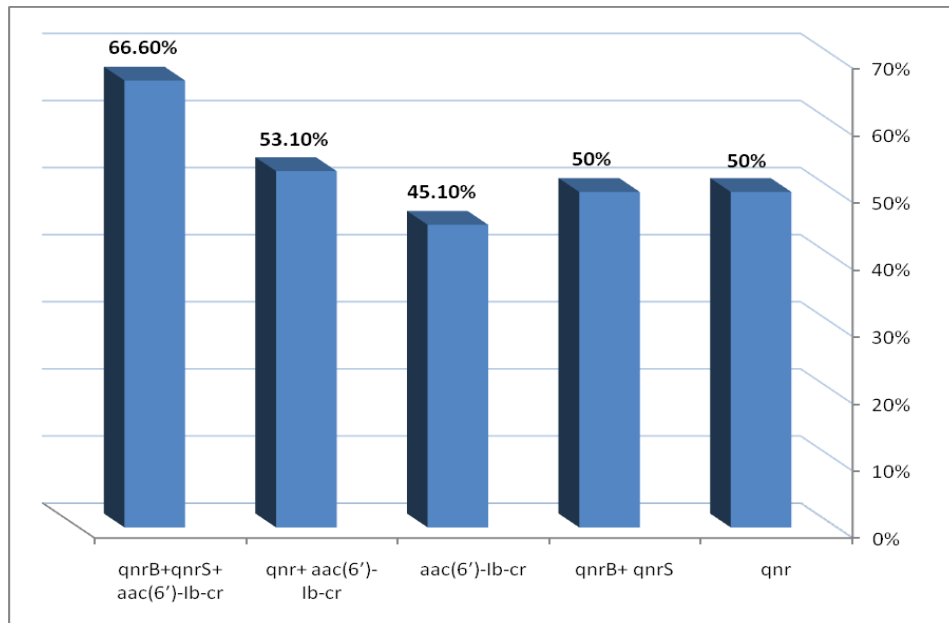
قد لا يقتصر على حماية الجراثيم من تأثير السيبروفلوكساسين، بل إنه قد يمتد ليساهم في خلق طفرات صبغية قادرة على البقاء والمقاومة [41, 45].

### 5.7. التأثير التآزري لمورثات المقاومة:

من الممكن أن تتضافر الآلية الأنزيمية للمقاومة (*aac(6')-Ib-cr*) مع آلية حماية الأنزيم الهدف (*qnr*) وصولاً إلى مقاومة هامة من الناحية السريرية [61]، مع إمكانية ازدياد قيم MIC عدة أضعاف ما هي عليه فيما لو كانت مورثة *qnr* وحيدة [96]

وقد أظهرت الدراسة الحالية أن 45.1% من العزلات التي تحوي مورثة *aac(6')-Ib-cr* هي من النمط شديد المقاومة MIC (64 - 256) مكغ/مل، وارتفعت النسبة السابقة لتصبح 53.1% عند وجود كلا المورثتين *qnr+ aac(6')-Ib-cr* في نفس العزلات، بالمقابل فلن 66.6% من العزلات التي تحوي ثلاث مورثات (*qnrB+qnrS+ aac(6')-Ib-cr*) هي من النمط شديد المقاومة (شكل 35)، مما يشير إلى إمكانية حدوث التآزر بين تلك المورثات وبالتالي زيادة المقاومة [34].

لا ينطبق ما سبق على مورثة *qnr*، فقد أظهرت الدراسة الحالية (شكل 35) ثبات في النسبة المئوية للعزلات شديدة المقاومة (50%) والتي تحوي مورثة *qnr* واحدة أو أكثر، مما يشير إلى عدم وجود تأثير تآزري لتلك المورثات [71].



شكل (35) : النسب المئوية للعزلات الحاملة لمورثة PMQR ضمن الهجال MIC (64 - 256) مكغ/مل

## 1.8. الاستنتاجات Conclusions

تتنوع أشكال المقاومة للكينولونات، فبالإضافة للطفرات الصبغية والتي تقود إلى مقاومة عالية المستوى للكينولونات، فإننا نشير إلى دور المورثات المحمولة على البلازميد والتي قد يؤدي بعضها لمقاومة ظاهرية منخفضة المستوى، إلا أنها لا تقل أهمية عن المقاومة الصبغية باعتبارها مؤهبة لحدوث مقاومة عالية المستوى. وقد أظهرت الدراسة الحالية مايلي:

- وجود نسبة عالية من العزلات لمقاومة السيبروفلوكساسين ضمن عزلاتنا المنتجة لأنزيمات ESBL التي تتخطى بمقاومتها لصادات البيتا لكتام لتصبح مقاومة لصادات حيوية من زمر أخرى (الكينولونات) وبالتالي نصبح أمام خيارات علاجية محدودة بسبب الفشل العلاجي للسيفالوسبورينات والتي تعد الخط الأول في العلاج.
- انتشار المورثات PMQR بنسب عالية ضمن عزلات منتجة لأنزيمات ESBL.
- تعتبر مورثات PMQR المحمولة على البلازميدات سبباً هاماً لمقاومة السيبروفلوكساسين ويعد النمط الطافر *aac(6')-Ib-cr* هو الأكثر انتشاراً ويليه مورثة *qnr* مع غياب مورثة المضخة *qepA*.
- كانت مورثة *qnrB* الأكثر انتشاراً من بين مورثات الـ *qnr* وتلتها مورثة *qnrS* مع غياب لمورثة *qnrA*.
- انتشار المورثة *aac(6')-Ib-cr* ضمن عزلات الإشريكية القولونية بشكل أكثر تواتراً مما هو عليه ضمن الكليبيسيلة الرئوية، أما بالنسبة لمورثات *qnr* فكانت أكثر انتشاراً ضمن الكليبيسيلة الرئوية.
- دور مورثة *aac(6')-Ib-cr* في حدوث المقاومة الجرثومية للسيبروفلوكساسين.
- انتشار مورثات *qnr* المحمولة عادة على البلازميد ضمن صبغيات بعض العزلات الجرثومية المدروسة مما يدل على إمكانية حدوث اندماج *integration* و يعزز دورها في حدوث المقاومة.
- الدور التآزري لمورثات PMQR وعلاقته بارتفاع قيم الـ MIC.

## 2.8. توصيات Recommendations

بعد التوصل للنتائج السابقة، يجب التأكيد على ما يلي:

- تعزيز دور المسؤولين في وزارة الصحة والهيئات التابعة لها خاصة (هيئة المخابر) لتطبيق المقاييس العالمية في إجراء اختبار التحسس الجرثومي في كل مخابر التحليل والابتعاد عن المعالجة التجريبية.
- عدم المعالجة التجريبية بالسيبروفلوكساسين في حال فشل العلاج بالبنسلينات أو السيفالوسبورينات المترافق إنتاج أنزيمات ESBL نظراً للارتباط الحاصل بين مورثات PMQR و ESBL.



- إجراء مثل هذه الأبحاث بشكل دوري ومستمر لمراقبة مدى تطور مقاومة الجراثيم تجاه الصادات الحيوية ، وذلك لمعرفة الصادات الحيوية الفعالة في علاج الأحماج الجرثومية المختلفة، ونقل أحدث ما تتوصل إليه هذه الأبحاث المحلية عبر الندوات أو المجالات المختصة لتكون في متناول الطبيب المعالج.
- دراسة مورثات *aac(6')-Ib-cr* على مستوى القطر لارتباطها بالعزلات المقاومة للسيبروفلوكساسين.
- أهمية التحري عن مورثات *qnr* حتى ضمن العزلات الحساسة بسبب دورها في تحفيز حدوث طفرات مقاومة
- متابعة التحري عن مورثات المقاومة للكينولونات المحمولة على الصبغي لتفسير حدوث المقاومة ضمن العزلات الخالية من مورثات PMQR
- التحري عن مورثات المقاومة للصادات الاخرى لتكوين بيانات كاملة عن الوبائية في سوريا، أسوة بالدول الاخرى المجاورة.
- التأكيد على مبدأ تكامل الأبحاث بين الكليات المختلفة وأهميته في عملية البحث العلمي بحيث نبدأ من حيث انتهى الآخرون.

## 9 . المراجع References

1. Mainous A G, Pomeroy C 2001. **Management of Antimicrobials in Infectious Diseases**, Humana Press.
2. Li X-Z. 2005- **Quinolone resistance in bacteria: emphasis on plasmid-mediated mechanisms**. *International Journal of Antimicrobial Agents*; 25:453-463.
3. Jacoby G A. 2005- **Mechanisms of Resistance to Quinolones**. *Clinical Infectious Diseases*; 41.
4. Robicsek A, Jacoby G A, Hooper D C. 2006- **The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance**. *Lancet Infect Dis*; 6:10,629-640.
5. Nordmann P, Poirel L. 2005 - **Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae**. *J Antimicrob Chemother*; 56:3,463-469.
6. Andriole V T. 2005- **The quinolones: past, present, and future**. *Clin Infect Dis*; 41 Suppl 2:S113-119.
7. Mayers D L. 2009- **Antimicrobial Drug Resistance**, Humana Press.
8. Mitscher L A . 2005- **Antibiotic Resistance Chemical Review**
9. Andriole V T. 2000- **The Quinolones**, Academic Press.
10. Fong I W. 2008- **Antimicrobial Resistance and Implications for the Twenty-First Century**, springer.
11. Wax R G , Lewis K, Salyers A A, Taber H. 2008- **Bacterial Resistance to Antimicrobials**. CRC press.
12. Denyer S P, Hodges N A, Gorman S P. 2004- **Pharmaceutical Microbiology**. Blackwell Science.
13. Harvey R A. 2012- **Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology**. Lippincott Williams & Wilkins.

14. Drlica K Z X.1997- **DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones.** *Microbiol Mol Biol Rev* 61:377-392.
15. Hooper D C.1998- **Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases, and anti-topoisomerase resistance.** *Clin Infect Dis*;27:S54-S63.
16. Karah N, Poirel L, Bengtsson S, Sundqvist M, Kahlmeter G, Nordmann P, Sundsfjord A, Samuelsen O.2010- **Plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr and aac(6')-Ib-cr in Escherichia coli and Klebsiella spp. from Norway and Sweden .***Diagn Microbiol Infect Dis*;66:4,425-431.
17. Shea ME H H.1999- **Interactions between DNA helicases and frozen topoisomerase IV-quinolone-DNA ternary complexes.** *J Biol Chem*;274:22747-22754.
18. Ball P.2000- **Quinolone generations: natural history or natural selection?** *J Antimicrob Chemother*;46:17–24.
19. Piddock LJ.1998- **Fluoroquinolone resistance: overuse of fluoroquinolones in human and veterinary medicine can breed resistance.** *BMJ*;317:1029–1030.
20. Ena J L-P M, Martinez-Peinado C.1998- **Emergence of ciprofloxacin resistance in Escherichia coli isolates after widespread use of fluoroquinolones.** *Diagn Microbiol Infect Dis*;30:103–107.
21. Cizman M O A, Krizan-Hergouth V.2001- **Correlation between increased consumption of fluoroquinolones in outpatients and resistance of Escherichia coli from urinary tract infections.** *J Antimicrob Chemother* 47:502.
22. Dalhoff A.2012- **Global Fluoroquinolone Resistance Epidemiology and Implications for Clinical Use.** *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases.*
23. WM. S.2003- **Maintaining fluoroquinolone class efficacy: review of influencing factors.** *Emerg Infect Dis*;9:1–9.
24. Wang H D-F J L, Chen M, Levy S.B.2001- **Genetic Characterization of Highly Fluoroquinolone-Resistant Clinical Escherichia coli Strains From China: Role of acrR Mutations.** *J Antimicrob Chemother*;45:1515-1521.
25. Li JB Y Y, Ma YL.2001- **Prevalence and analysis of risk factors for infections caused by resistant Escherichia coli strains in Anhui, China.** *Infection*;29:228.231–
26. Neuhauser MM W R, Rydman R.2003- **Antibiotic resistance among Gramnegative bacilli in US intensive care units.** *JAMA*;289:885-888.
27. Grundmann H S P, Bruninsman N.2004- **EARSS report on increasing fluoroquinolone resistance among Escherichia coli in Europe.** *Clin Microbiol Infect*;10:64
28. Oteo J, Aracil B,JF. H.1999- **Do the quinolones still constitute valid empirical therapy for community-acquired urinary tract infections in Spain?** *Clin Microbiol Infect*;5:654-656.
29. Munshi MH S D, Haider K.1987- **Plasmid-mediated resistance to nalidixic acid in Shigella dysenteriae type 1.** *Lancet*;ii:419–421.
30. RATTAN A.1999- **Mechanisms of resistance to fluoroquinolones.** *The national medical journal of INDIA*;12.
31. Normark B H,Normark S.2002- **Evolution and spread of antibiotic resistance.** *J Intern Med*;252:2,91-106.
32. - 32Morais Cabral JH J A, Smith CV, Shikotra N, Maxwell A,Liddington RC.1997- **Crystal structure of the breakage-reunion domain of DNA gyrase.** *Nature*;388:903–906.
33. K .P.2005- **Efflux-mediated antimicrobial resistance.** *J Antimicrob Chemother*;56:20–51.
34. Hooper D C.2001- **Emerging Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance.** *Emerging Infectious Diseases*;7.

35. Rodríguez-Martínez J M.2005- **Mechanisms of plasmid-mediated resistance to quinolones.** *Enferm Infecc Microbiol Clin*;23:1,25-31.
36. Hooper DC. Mechanisms of quinolone resistance. In: Hooper DC R E, eds.2003- **Quinolone antimicrobial agents. 3rd edn.Washington, DC. American Society for Microbiology Press** 41–67.
37. Morais Cabral JH J A, Smith CV, Shikotra N, Maxwell A, Liddington RC.1997- **Crystal structure of the breakage-reunion domain of DNA gyrase.** *Nature*;388:903-906.
38. J. R.2003- **Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations,decreased accumulation and DNA gyrase protection.** *J Antimicrob Chemother*;51:1109–1117.
39. Gomez-Gomez JM B J, Espinosa De Los Monteros LE, Baquero MR, Baquero F, Martinez JL.1997- **In vitro plasmid-encoded resistance to quinolones.** *FEMS Microbiol Lett*;154:271–276.
40. Normark BH N S.2002- **Evolution and spread of antibiotic resistance.** *J Intern Med*;252:91–106.
41. Martinez-Martinez L, Pascual A, Jacoby G A.1998- **Quinolone resistance from a transferable plasmid.** *Lancet*;351:9105,797-799.
42. Levy S.2002- **The antibiotic paradox: how the misuse of antibiotics destroys their curative powers. 2nd ed. Cambridge. MA: Perseus Publishing.**
43. Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Shibata N, Kato H, Shibayama K, Konda T, Arakawa Y.2007- **New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA , found in an Escherichia coli clinical isolate.** *Antimicrob Agents Chemother*;51:9,3354-3360.
44. Tran JH J G.2002- **Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance.** *Proc Natl Acad Sci USA*;99:5638–5642.
45. Strahilevitz J, Jacoby G A, Hooper D C, Robicsek A.2009- **Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat.** *Clin Microbiol Rev*;22:4,664-689.
46. Hata M S M, Matsumoto M.2005- **Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in Shigella fl exneri 2b.** *Antimicrob Agents Chemother*;49:801–803.
47. Kathryn Gay A R, Jacob Strahilevitz, Chi Hye Park, George Jacoby, Timothy J. Barrett, Felicita Medalla, Tom M. Chiller, David C. Hooper.2006- **Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in Non-Typhi Serotypes of Salmonella enterica.** *Clinical Infectious Diseases*;43:297–304.
48. Jacoby G A, Walsh K E, Mills D M, Walker V J, Oh H, Robicsek A, Hooper D C.2006- **qnrB, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance.** *Antimicrob Agents Chemother*;50:4,1178-1182.
49. Poirel L ,Rodriguez-Martinez JM, Mammeri H, Liard A,P. N.2005- **Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA.** *Antimicrob Agents Chemother*;49:3523–3525.
50. Jacoby GA C N, Waites KB.2003- **Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance.** *Antimicrob Agents Chemother*;47:559–562.
51. Touati A, Brasme L, S. B, Gharout A, J. M,K.D. C.2008- **First Report of qnrB-producing Enterobacter cloacae and qnrA-producing Acinetobacter baumannii Recovered from Algerian Hospitals.** *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*;60:287-290.
52. Poirel L V D L, Mammeri H, Nordmann P. .2005- **Association of plasmid-mediated quinolone resistance with extended-spectrum betalactamase VEB-1.** *Antimicrob Agents Chemother*;49:3091–3094.

53. Henrichfreise B P s W, Wiegand I ,Wiedemann B.2005- **Resistance mechanisms and epidemiology of multiresistant Pseudomonas aeruginosa strains from Germany.** *J Antimicrob Chemother* C2-1423.
54. Wang M Y X, Wu S, Liu Y, Zhang Y. .2005- **Prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnrA among consecutive clinical strains isolated from a teaching hospital in Shanghai, China.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* C2-785.
55. Vetting MW H S, Fajardo JE.2006- **Pentapeptide repeat proteins.** *Biochemistry*;45:1–10.
56. Kobe B D J.1995- **A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands.** *Nature*;374:183-186.
57. Teichmann S.1998- **Structure and distribution of pentapeptide repeats in bacteria.** *Protein Sci*;7:1477–1480.
58. Bateman A M A, Teichmann SA.1998- **Structure and distribution of pentapeptide repeats in bacteria.** *Protein Sci*;7:1477-1480.
59. Rodriguez-Martinez J M.2005- **Mechanisms of plasmid-mediated resistance to quinolones.** *Enferm Infecc Microbiol Clin*;23:1,25-3.1
60. Katie L. Hopkins R H D, E. John Threlfall.2005- **Mechanisms of quinolone resistance in Escherichia coli and Salmonella: Recent developments.** *International Journal of Antimicrobial Agents*;25:358–373.
61. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby G A, Macielag M, Abbanat D, Park C H, Bush K, Hooper D C.2006- **Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase.** *Nat Med*;12:1,83-88.
62. Boyd DA T S, Christianson S.2004- **Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase involved in an outbreak in longterm- care facilities in Toronto, Canada.** *Antimicrob Agents Chemother*;48:3758–3764.
63. Rodriguez-Martinez JM V C, Pascual A, Garcia I, Martinez- Martinez L.2006- **Correlation of quinolone resistance levels and differences in basal and quinolone-induced expression from three qnrA-containing plasmids.** *Clin Microbiol Infect*;12:440–445.
64. Wang M, Tran J H, Jacoby G A, Zhang Y, Wang F, Hooper D C.2003- **Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of Escherichia coli from Shanghai, China.** *Antimicrob Agents Chemother*;47:7,2242-2248.
65. Kim H B, Park C H, Kim C J, Kim E C, Jacoby G A, Hooper D C.2009- **Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period.** *Antimicrob Agents Chemother*;53:2,639-645.
66. Cattoir V, Poirel L, Nordmann P.2008- **Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an Escherichia coli isolate from France.** *Antimicrob Agents Chemother*;52:10.3801-3804
67. Li X-Z Z L, Poole K .2000- **Interplay between the MexA-MexBOprM multidrug efflux system and the outer membrane barrier in the multiple antibiotic resistance of Pseudomonas aeruginosa.** *J Antimicrob Chemother*;45:433–436.
68. DM. L.2001- **Of Pseudomonas, porins, pumps and carbapenems.** *J Antimicrob Chemother*;47:247–250.
69. Lomovskaya O L A, Hoshino K.1999- **Use of a genetic approach to evaluate the consequences of inhibition of efflux pumps in Pseudomonas aeruginosa.** *Antimicrob Agents Chemother*;43:1340–1346.
70. Martinez-Martinez L P A, Garcia I.2003- **Interaction of plasmid and host quinolone resistance.** *J Antimicrob Chemother*;51:1037–1039.

71. Cattoir V, Poirel L, Nordmann P. 2007- **Plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrB4 identified in France in an Enterobacter cloacae clinical isolate coexpressing a QnrS1 determinant.** *Antimicrob Agents Chemother*;51:7,2652-2653.
72. Yan Boucher M L, Jeremy E. Koenig ,and H.W. Stokes. 2007- **Integrans: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria.** *Trends in Microbiology*;15.
73. Bennett P M. 1999- **Integrans and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*;43:1-4.
74. Collis CM H R. 1995- **Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrans.** *Antimicrob Agents Chemother*;39:155–162.
75. Poirel L P J, Calvo L, Rodriguez-Martinez JM, Church D, Nordmann P. 2006- **In vivo selection of fl uoroquinolone-resistant Escherichia coli isolates expressing plasmid-mediated quinolone resistance and expanded-spectrum beta-lactamase.** *Antimicrob Agents Chemother*;50:1525–1527.
76. Lautenbach E S B, Bilker WB, Patel JB, Edelstein PH, Fishman NO. 2001- **Epidemiological investigation of fl uoroquinolone resistance in infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae.** *Clin Infect Dis*;33:1288–1294.
77. Aguiar J M, Chacon J, Canton R, Baquero F. 1992- **The emergence of highly fluoroquinolone-resistant Escherichia coli in community-acquired urinary tract infections.** *J Antimicrob Chemother*;29:3,349-350.
78. [www.ecdc.europa.eu/](http://www.ecdc.europa.eu/)
79. Ling TK X J, Yu Y, Lee CC, Ye H, Hawkey PM. 2006- **Multicenter antimicrobial susceptibility survey of gram-negative bacteria isolated from patients with community-acquired infections in the People's Republic of China.** *Antimicrob Agents Chemother* 50:374-378.
80. [www.cddep.org/blog/posts/exploring\\_resistancemap\\_rise\\_fluoroquinolone\\_resistance\\_p\\_art\\_1](http://www.cddep.org/blog/posts/exploring_resistancemap_rise_fluoroquinolone_resistance_p_art_1)
81. Hart C A, Kariuki S. 1998- **Antimicrobial resistance in developing countries.** *BMJ*;317:7159,647-650.
82. السبيل ابراهيم , يوسف نهاد, الفارس شاكر . 2011- دراسة المقاومة على الصادات المنتجة وغير المنتجة لانزيمات بيتا لاكتاماز ممتدة الطيف ESBLs عند الإشريكية القولونية والكلبسيلا الرئوية والمعزولة من مرضى مشافي حلب الجامعية. مجلة بحوث جامعة حلب.
83. Borg M A, Scicluna E, de Kraker M, van de Sande-Bruinsma N, Tiemersma E, Gur D, Ben Redjeb S, Rasslan O, Elnassar Z, Benbachir M, Pieridou Bagatzouni D, Rahal K, Daoud Z, Grundmann H, Monen J. 2006- **Antibiotic resistance in the southeastern Mediterranean-- preliminary results from the ARMed project.** *Euro Surveill*;11:7,164-167.
84. Mohamed H. Al-Agamy S A Z. 2012- **Mechanisms of fluoroquinolones resistance in Escherichia coli isolates from Saudi Arabia.** *African Journal of Microbiology Research*;6:1,155-159.
85. [www.sgs.com/](http://www.sgs.com/)
86. Todar. 2007-11-30. K. "Pathogenic E. coli". *Online Textbook of Bacteriology. University of Wisconsin–Madison Department of Bacteriology.*
87. R. Podschun U. 1998- **Klebsiella spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors.** *clinical microbiology reviews*;11:589–603.
88. Brenner D J, Krieg N R, Staley J T 2005 . *Bergey's manual of systematic Bacteriology.* 2nd ed. springer.

89. Cattoir V, Nordmann P. 2009- **Plasmid-mediated quinolone resistance in gram-negative bacterial species: an update.** *Curr Med Chem*;16:8,1028-1046.
90. Salyers AA, Gupta A, Y W. 2004- **Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes.** *Trends Microbiol*;12:9,412-416.
91. Nathisuwan S, Burgess D, Lewis J. 2001- **Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: Epidemiology, Detection, and Treatment.** *Pharmacotherapy*;21:8,920-928.
92. Martinez-Martinez L, Eliecer Cano M, Manuel Rodriguez-Martinez J, Calvo J, Pascual A. 2008- **Plasmid-mediated quinolone resistance.** *Expert Rev Anti Infect Ther*;6:5,685-711.
93. Rodriguez-Martinez J M, Cano M E, Velasco C, Martinez-Martinez L, Pascual A. 2011- **Plasmid-mediated quinolone resistance: an update.** *J Infect Chemother*;17:2,149-182.
94. George A, Jacoby N C, and Ken B. Waites. 2003- **Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance.** *Antimicrob Agents Chemother*;47:559-562.
95. Wang M, Sahm D F, Jacoby G A, Hooper D C. 2004- **Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with the qnr gene in Klebsiella pneumoniae clinical isolates in the United States.** *Antimicrob Agents Chemother*;48:4,1295-1299.
96. Park C H, Robicsek A, Jacoby G A, Sahm D, Hooper D C. 2006- **Prevalence in the United States of aac(6')-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme.** *Antimicrob Agents Chemother*;50:11,3953-3955.
97. Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm D F, Jacoby G A, Hooper D C. 2006- **qnr prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States.** *Antimicrob Agents Chemother*;50:8,2872-2874.
98. Pitout J D, Wei Y, Church D L, Gregson D B. 2008- **Surveillance for plasmid-mediated quinolone resistance determinants in Enterobacteriaceae within the Calgary Health Region, Canada: the emergence of aac(6')-Ib-cr.** *J Antimicrob Chemother*;61:5,999-1002.
99. Kaase M, M. Wellmann, F. Szabados, A. Anders, B. Kleine, T. Sakinc, S. G. Gatermann. .2008- **High prevalence of aac(6')-Ib-cr in extended-spectrum B-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates from Germany.** *Antimicrob. Agents Chemother.*
100. Ambrozic Avgustin J, R. Keber, K. Zerjavic, T. Orazem, M. Grabnar. 2007- **Emergence of the quinolone resistance-mediating gene aac(6')-Ib-cr in extended-spectrum-B-lactamase-producing Klebsiella isolates collected in Slovenia between 2000 and 2005.** *Antimicrob. Agents Chemother.*;51:4171-4173.
101. Warburg G, Korem M, Robicsek A, Engelstein D, Moses A E, Block C, Strahilevitz J. 2009- **Changes in aac(6')-Ib-cr prevalence and fluoroquinolone resistance in nosocomial isolates of Escherichia coli collected from 1991 through 2005.** *Antimicrob Agents Chemother*;53:3,1268-1270.
102. EUCAST. 2003- **Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution.** *Clinical Microbiology and Infection*;9:7.
103. CLSI. 2012- **Performance standards for antimicrobial susceptibility Testing. twenty - second informational supplement, M100-S20.** *Clinical and Laboratory Standards Institute; Wayne press, Pennsylvania.*;32:188.
104. Vanpelt-Verkuil E, Van B A, HAYS J. 2008- **PCR Primers. In Principles and Technical Aspects of PCR Amplification.** *Springer, The Netherlands*;34-39.
105. Katcher H L A S. 1994- **A distinctive property of Tth DNA polymerase: Enzymatic amplification in the presence of phenol.** *BioTechniques*;16:84-92.

106. Demeke T A G J.2010- **Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits.** . *Analytical and Bioanalytical Chemistry*; 396:1977-1990.
107. Kary B, Mullis.1990- **The unusual origin of the polymerase chain reaction.** *Scientific American.*;240:56-65.
108. Michael J. McPherson, Møller S G 2006. *PCR*, Taylor & Francis Group.
109. Birch D. E K L, Wong J, Zangenberg G. A, Zoccoli M. A, McKinney N,, Y Y K K.1996- **Simplified hot start PCR.** *Nature*;381:445-446.
110. Snyder L,W. C 2007. *Molecular Biology Manipulations with DNA Molecular Genetics of Bacteria.* 3rd edition.
111. McDermott P.F,Walker R.D W D G.2003- **Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance.** *International Journal of Toxicology.*;22:135-143.
112. David G, Roger F, Peter D, Mark W 2007. *Antimicrobial chemotherapy, Oxford University Press.* ,
113. Pakzad I , Ghafourian S, Taherikalani M, Sadeghifard N, Abtahi H, Rahbar M, Mansory Jamshidi N.2011- **qnr Prevalence in Extended Spectrum Beta-lactamases (ESBLs) and None-ESBLs Producing Escherichia coli Isolated from Urinary Tract Infections in Central of Iran.** *Iran J Basic Med Sci*;14:5,458-464.
114. Oktem I M, Gulay Z, Bicmen M, Gur D.2008- **qnrA prevalence in extended-spectrum beta-lactamase-positive Enterobacteriaceae isolates from Turkey.** *Jpn J Infect Dis*;61:1,13-17.
115. Rios E, Rodriguez-Avial I, Rodriguez-Avial C, Hernandez E, Picazo J J.2010- **High percentage of resistance to ciprofloxacin and qnrB19 gene identified in urinary isolates of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli in Madrid, Spain.** *Diagn Microbiol Infect Dis*;67:4,380-383.
116. Cremet L, Caroff N, Dauvergne S, Reynaud A, Lepelletier D, Corvec S.2011- **Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in ESBL Enterobacteriaceae clinical isolates over a 1-year period in a French hospital.** *Pathol Biol (Paris)*;59:3,151-156
117. Kanamori H, Navarro R B, Yano H, Sombrero L T, Capeding M R, Lupisan S P, Olveda R M, Arai K, Kunishima H, Hirakata Y, Kaku M.2011- **Molecular characteristics of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of Enterobacteriaceae from the Philippines.** *Acta Trop*;120:1-2,140-145.
118. Poirel L, Leviandier C, Nordmann P.2006- **Prevalence and genetic analysis of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA and QnrS in Enterobacteriaceae isolates from a French university hospital.** *Antimicrob Agents Chemother*;50:12,3992-3997.
119. Kanj S S, J. E. Corkill, Z. A. Kanafani, G. F. Araj, C. A. Hart, R. Jaafar,, Matar. G M. 2008.- **Molecular characterisation of extended-spectrum B-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella spp. isolates at a tertiary-care centre in Lebanon.** *Clin. Microbiol. Infect.*;14:501–504.
120. Lavilla S, Gonzalez-Lopez J J, Sabate M, Garcia-Fernandez A, Larrosa M N, Bartolome R M, Carattoli A, Prats G.2008- **Prevalence of qnr genes among extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain.** *J Antimicrob Chemother*;61:2,291-295.
121. Jiang Y, Zhou Z, Qian Y, Wei Z, Yu Y, Hu S, Li L.2008- **Plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr and aac(6')-Ib-cr in extended-spectrum beta-lactamase-**

- producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China.** *J Antimicrob Chemother*;61:5,1003-1006.
122. Hasan Nazik B B, Betigül Öngen, Mehmet Ilktaç, Mustafa Özyurt, Nuray Kuvat, Orhan Baylan, Hatun Keküllüoğlu, Tunçer Haznedaroğlu, and Fatih Mehmet Kelesoğlu. 2011- **Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in *Escherichia coli* Urinary Isolates from Two Teaching Hospitals in Turkey: Coexistence of TEM, SHV, CTX-M and VEB-1 Type  $\beta$ -lactamases.** *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*;10:32.333-5
123. Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy C J, Nordmann P. 2007- **Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates.** *J Antimicrob Chemother*;60:2,394-397.
124. Chen Y.T S H Y, Li L.H, Liao T.L, Wu K.M, Shiao Y.R, Yan J.J, Su I.J, Tsai,S.F L T L. 2006- **Complete Nucleotide Sequence of pK245, a 98-Kilobase Plasmid Conferring Quinolone Resistance and Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase Activity in a Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolate.** *J Antimicrob Chemother*;50:3861-3866.
125. Kehrenberg C H K L, Threlfall E. J, Stefan Schwarz. 2007- **Complete nucleotide sequence of a small qnrS1-carrying plasmid from *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhimurium DT193.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.;60:903-905.
126. Park Y J, Yu J K, Lee S, Oh E J, Woo G J. 2007- **Prevalence and diversity of qnr alleles in AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii* and *Serratia marcescens*: a multicentre study from Korea.** *J Antimicrob Chemother*;60:4,868-871.
127. Perichon B, Courvalin P, Galimand M. 2007- **Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by qepA-mediated efflux in *Escherichia coli*.** *Antimicrob Agents Chemother*;51:7,2464-2469.
128. Gay K, Robicsek A, Strahilevitz J, Park C H, Jacoby G, Barrett T J, Medalla F, Chiller T M, Hooper D C. 2006- **Plasmid-mediated quinolone resistance in non-Typhi serotypes of *Salmonella enterica*.** *Clin Infect Dis*;43:3,297-304.
129. Kocsis B. 2012. **Plasmid-mediated fluoroquinolone resistance in Enterobacteriaceae.** *University of Verona.*
130. Nazik H, Öngen B, Kuvat N. 2008- **Investigation of plasmid-mediated quinolone resistance among isolates obtained in a Turkish intensive care unit.** *Jpn J Infect Dis*;61:4,310-312.
131. Cavaco L M, Hendriksen R S, Aarestrup F M. 2007- **Plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnrS1 detected in *Salmonella enterica* serovar *Corvallis* strains isolated in Denmark and Thailand.** *J Antimicrob Chemother*;60:3,704-706.
132. Hopkins K L, Day M, Threlfall E J. 2008- **Plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica*, United Kingdom.** *Emerg Infect Dis*;14:2,340-342.
133. Kehrenberg C, Friederichs S, de Jong A, Schwarz S. 2008- **Novel variant of the qnrB gene, qnrB12, in *Citrobacter werkmanii*.** *Antimicrob Agents Chemother*;52:3,1206-1207.



## 10. الملحقات

ملحق (1) مواصفات السلالات المرجعية لكل من الإشريكية القولونية والكليبيسيلا الرئوية



ATCC® Number: 25922

- Organism:** *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers  
**Designations:** FDA strain Seattle 1946 [DSM 1103, NCIB 12210]  
**Isolation:** clinical isolate  
**Depositor:** FDA  
**History:** ATCC <-- FDA <-- F Schoenknecht  
**Biosafety Level:** 1  
**Shipped:** freeze-dried  
**Growth** ATCC medium 18: Trypticase soy agar  
**Conditions:** **Temperature:** 37°C  
**Atmosphere:** Aerobic  
**Permits/Forms:** In addition to the MTA mentioned above, other ATCC and/or regulatory permits may be required for the transfer of this ATCC material. Anyone purchasing ATCC material is ultimately responsible for obtaining the permits. Please [click here](#) for information regarding the specific requirements for shipment to your location.  
**Cross** Nucleotide (GenBank) : AF038431 *Escherichia coli* DNA gyrase A (gyrA)  
**References:** gene, partial cds.  
Nucleotide (GenBank) : AX110212 Sequence 945 from Patent WO0123604.  
Nucleotide (GenBank) : AX110242 Sequence 975 from Patent WO0123604.  
Nucleotide (GenBank) : AX111547 Sequence 2280 from Patent WO0123604.  
Nucleotide (GenBank) : X80724 *E. coli* (ATCC 25922) gene for 16S rRNA.  
**Applications:** Control Culture [92260] [92376] [92377]  
control strain [21528] [21531] [92352]  
evaluation of Mueller-Hinton agar [21524] [21585]  
media testing [21529] [92345] [92390] [92429] [92819] [92844] [92845]  
quality control [92216]  
quality control strain [92099] [92126] [92135] [92137] [92146] [92147]  
[92150] [92153] [92159] [92160] [92163]  
susceptibility disc testing [21523] [92224] [92354] [92355]  
susceptibility disc testing cephalixin [45872]  
susceptibility disc testing cephaloglycin [45872]  
Food testing  
susceptibility disc testing cephaloridine cephalomycin [21533] [45872]  
susceptibility disc testing cephalothin [45872]  
susceptibility disc testing chloramphenicol [58588]  
susceptibility disc testing colistin colimycin [58588]  
susceptibility disc testing gentamicins gentamicin [58588]  
susceptibility disc testing kanamycin [58588]  
susceptibility disc testing nalidixic acid [58588]

susceptibility disc testing neomycin [58588]  
 susceptibility disc testing tetracycline [58588]  
 susceptibility testing [21525] [21527] [21533] [90283] [92353] [92422]  
 [92423] [92424] [92425] [92788]  
 testing [92374]  
 MIC (ug/ml): Ampicillin 2-8; Amoxicillin-clavulanate 0.5; Aztreonam 0.06-0.25;  
 Cefotaxime 0.03-0.12; Cefpodoxime 0.25-1; Ceftazidime 0.06-0.5  
 Ceftriaxone 0.03-0.12; Cefoxitin 2-8; Chloramphenicol 2-8; Ciprofloxacin 0.004-  
 0.015; Gentamicin 0.25-1;Tetracycline 0.5-2.  
 quality control strain for Abbott, API, Autobac, BBL, bioMerieux Vitek,  
 Biosynth, Difco, IDS, Micro-Media, MicroScan [Reg TM], Roche Diagnostics,  
 and Sensititre products  
**Related Products:** Also available as SafeTsource™:ATCC 25922NA  
 Purified DNA: ATCC 25922D-5

Bacteria	
ATCC® Number:	700603™
<b>Organism:</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> (Schroeter) Trevisan deposited as <i>Klebsiella pneumoniae</i> (Schroeter) Trevisan
<b>Designations:</b>	K6 [CCUG 45421, LMG 20218, MCV37]
<b>Isolation:</b>	Urine from hospitalized patient, Richmond, VA, 1994
<b>Depositor:</b>	JM Swenson
<b>History:</b>	ATCC <<--JM Swenson<<--M.J. Ferraro <<-- G. Jacoby <<-- H. Dalton
<b>Biosafety Level:</b>	2
<b>Shipped:</b>	freeze-dried
<b>Growth Conditions:</b>	<b>ATCC medium3:</b> Nutrient agar or nutrient broth <b>Temperature:</b> 37°C <b>Atmosphere:</b> Aerobic
<b>Permits/Forms:</b>	In addition to the MTA mentioned above, other ATCC and/or regulatory permits may be required for the transfer of this ATCC material. Anyone purchasing ATCC material is ultimately responsible for obtaining the permits. Please <a href="#">click here</a> for information regarding the specific requirements for shipment to your location.
<b>Cross References:</b>	Nucleotide (GenBank) : <a href="#">AX111170</a> Sequence 1903 from Patent WO0123604. Nucleotide (GenBank) : <a href="#">AF132290</a> <i>Klebsiella pneumoniae</i> plasmid-encoded extended-spectrum beta-lactamase (bla SHV-18) gene, complete cds.
<b>Comments:</b>	MIC (ug/ml): Ampicillin >64; Amoxicillin-clavulanate 8; Aztreonam 64; Aztreonam-clavulanate <=0.25; Cefotaxime 8; Cefotaxime-clavulanate <=0.25; Cefpodoxime 16; Cefpodoxime-clavulanate 1; Ceftazidime 32 MIC (ug/ml): Ceftazidime-clavulanate 1; Ceftriaxone 16; Ceftriaxone-clavulanate <=0.25; Cefepime 1; Cefoxitin 32; Chloramphenicol >32; Ciprofloxacin 0.5; Gentamicin 8 MIC (ug/ml): Imipenem <=1; Piperacillin >128; Piperacillin-tazobactam 16; Tetracycline 16; Tobramycin 4; Trimethoprim-sulfamethoxazole 2
<b>Applications:</b>	Produces beta-lactamase SHV-18 Quality control strain Resistant to ampicillin Resistant to aztreonam Resistant to cefoxitin

Resistant to cefpodoxime Resistant to ceftazidime Resistant to chloramphenicol Resistant to piperacillin Resistant to tetracycline Sensitive to amoxicillin-clavulanate Respiratory research Sensitive to cefepime Intermediate resistance for cefotaxime Sensitive to ciprofloxacin Sensitive to imipenem Sensitive to piperacillin-tazobactam Intermediate resistance for Tobramycin Sensitive to trimethoprim-sulfamethoxazole Susceptibility disc testing Susceptibility testing Intermediate resistance to ceftriaxone and gentamicin Control for extended-spectrum beta-lactamase production	
<b>Related Products:</b>	Purified DNA: ATCC <u>700603D-5</u>

## الملحق (2) بروتوكول استخلاص الدنا البلازميدي Plasmid DNA Extraction Protocol

يتضمن هذا الملحق تفاصيل بروتوكول استخلاص الدنا البلازميدي من الإشريكية القولونية نقلاً عن التعليمات الواردة في الكيت والوارد من قبل الشركة المصنعة (QIAprep® Spin Miniprep Kit، Qiagen، USA).

### مكونات الكيت:

أعمدة الاستخلاص QIAprep Mini Spin Columns، أنابيب جمع (2ml)، وقاء P1 (20 ml)، وقاء P2 (20 ml)، وقاء N3 (30 ml)، وقاء PB (30 ml)، وقاء PE (2x6 ml)، وقاء EB (15 ml)، جفاعة أنزيم RNase A، المحلول الملون LyseBlue 20 مكل.

### تحضير المحاليل:

1-الوقاء P1: يضاف أنزيم RNase A إلى الوقاء P1، تمزج ثم تحفظ في درجة حرارة (2-8 C°)، ويمكن أن يضاف المحلول الملون LyseBlue إلى هذا الوقاء قبل الاستخدام (حيث يضاف 20 مكل من المحلول الملون إلى 20 ml من الوقاء).

2-الوقاء PE: يتم تمديد الوقاء باستخدام الإيثانول بتركيز (96-100%) قبل الاستخدام، ثم يحفظ بدرجة حرارة الغرفة مع إحكام الإغلاق.

## طريقة الاستخلاص:

### QIAprep Spin Procedure

Pelleted bacteria



Resuspend  
Lyse  
Neutralize



Bind



Wash



Elute



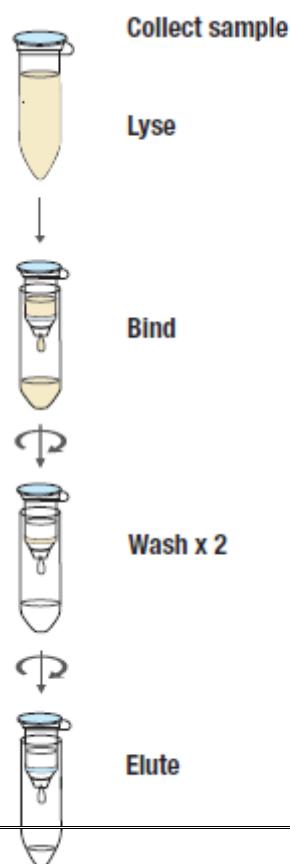
Pure plasmid DNA

- تحل الرسابة الجرثومية باستخدام 250 مكل من الوقاء P1، ثم تنقل إلى أنبوب صغير.
- يضاف 250 مكل من الوقاء P2 و يمزج المحلول بقلب الأنبوب من 4 إلى 6 مرات. في حال أضيف المحلول الملون LyseBlue إلى الوقاء P1 يتحول لون المعلق الخلوي إلى الأزرق.
- يضاف 350 مكل من الوقاء N3 و يمزج المحلول بقلب الأنبوب من 4 إلى 6 مرات ليتشكل معلق لزج . في حال إضافة المحلول الملون LyseBlue يجب الاستمرار بمرج المحلول السابق حتى تزول آثار اللون الأزرق، ويصبح المحلول الناتج عديم اللون .
- يثقل المحلول لمدة (10) دقائق بقوة 15000 rpm لتتشكل رسابة بيضاء مضغوطة.
- ينقل السائل الطافي الناتج في المرحلة الرابعة من الأنبوب إلى أعمدة QIAprep.
- تثقل العينة لمدة (30-60) ثانية، ويرمى السائل الناتج عن التثقل.
- تغسل أعمدة QIAprep باستخدام (0.5 ml) من الوقاء PB ثم تثقل العينة لمدة (30-60) ثانية، ويرمى السائل الناتج عن التثقل.
- يعاد غسل أعمدة QIAprep باستخدام (0.75 ml) وقاء KPE ثم تثقل العينة لمدة (30-60) ثانية ويرمى السائل الناتج عن التثقل .

- تتقل أعمدة QIAprep إلى أنبوب نظيف سعته (1.5 ml)، وللحصول على الدنا المدمص على أعمدة QIAprep يضاف 50 مكل من وقاء EB، أو ماء خالٍ من النكلياز في منتصف عمود QIAprep، ثم يترك لمدة دقيقة وبعد ذلك يثقل لمدة دقيقة.

### ملحق (3) بروتوكول استخلاص الـ DNA الجينومي للجراثيم سلبية الغرام:

الحجم 250	الحجم 50	المكون
5×1.2 ml	1.2 ml	محلول من أنزيم Proteinase K
5×1 ml	1 ml	محلول RNase A
55 ml	11 ml	محلولهاضم Digestion Solution
2×60 ml	24 ml	محلول محل Lysis Solution
40 ml	10 ml	وقاء مركز للغسل I (Wash Buffer I)
40 ml	10 ml	وقاء مركز للغسل II (Wash Buffer II)
150 ml	30 ml	وقاء للاستخلاص (PH ، 10mMTris-Cl) Elution Buffer ( 0.5 mM EDTA، 9.0
250	50	أعمدة تنقية الـ DNA الجينومي والموضوعة داخل أنابيب الجمع
250	50	أنابيب للجمع Collection Tubes



### مكونات الكيت GeneJET

يتمثل هذا البروتوكول بالخطوات الآتية:

- يتم جمع  $2 \times 10^9$  خلية جرثومية في أنبوب تثقيل (حجمه 1.5 - 2 ml) ثم يتم التثقيل على سرعة  $5000 \times g$  لمدة 10 min ثم يتم التخلص من السائل الطافي.
- يتم إضافة 180 مكل من محلول الهضم Digestion Solution ومن ثم 20 مكل من محلول أنزيم Proteinase K ويتم المزج بـ vortex أو بالماصة لضمان تجانس المزيج.

- يتم حضن العينة على درجة حرارة 56°C مع الوجود بين الحين والآخر أو باستخدام حمام مائي رجاج حتى تتحل الخلايا الجرثومية (تقريباً تحتاج إلى 30 min).
  - يتم إضافة 20 مكل من محلول RNase A، ويهز بالرجاجة ثم يحضن المزيج لمدة 10 min في درجة حرارة الغرفة.
  - يتم إضافة 200 مكل من محلول Lysis Solution إلى العينة، ثم تمزج مزجاً كتملاً بالرجاج لمدة 15 min حتى الحصول على مزيج متجانس .
  - يتم إضافة 400 مكل من إيتانول 50% ثم تمزج باستخدام الماصة.
  - يتم نقل المزيج إلى عمود الاستخلاص الخاص بالكيـت GeneJET Genomic DNA Purification Column والموضوع داخل أنبوب آخر خاص بالجمع، يتم التنقيـل لمدة 1 min على سرعة 6000×g، وبعد ذلك يتم التخلص من الأنبوب الحاوي على المزيج المثقل ووضع عمود الاستخلاص GeneJET Genomic DNA Purification في أنبوب جمع آخر بحجم 2 ml.
  - يتم إضافة 500 مكل من محلول الغسل Wash Buffer I (بعد إضافة الإيتانول إليه )، ثم يتم التنقيـل لمدة 1 min على سرعة 8000×g، وبعدها يزال المحلول الموضوع في أنبوب الجمع ويتم إعادة عمود الاستخلاص إلى أنبوب الجمع.
  - يتم إضافة 500 مكل من محلول الغسل Wash Buffer II (أيضاً بعد إضافة الإيتانول إليه ) إلى عمود الاستخلاص، ثم يتم التنقيـل لمدة 3 min على السرعة القصوى (12000 ×g) .
- اختياري: إذا كان هناك محلول متبقي في أنبوب الاستخلاص يتم عندها إفراغ أنبوب الجمع ثم إعادة تنقيـل الأنبوب لمدة 1 min على السرعة القصوى .
- يتم التخلص من أنبوب الجمع الحاوي على المحلول المثقل ونقل عمود الاستخلاص إلى أنبوب تنقيـل معقم حجمه 1.5 ml.
  - يتم إضافة 200 مكل من وقاء الاستخلاص Elution Buffer إلى وسط غشاء عمود الاستخلاص الخاص بالكيـت وذلك لعزل الـ DNA الجينومي، ثم يتم الحضن لمدة 2 min في درجة حرارة الغرفة، ثم التنقيـل لمدة 1 min على سرعة 8000×g.

#### ملاحظة:

- للوصول إلى مردود أعظمي من الـ DNA من الممكن إعادة خطوة وقاء الاستخلاص بإضافة 200 مكل من محلول Elution Buffer.
- إذا أردنا الحصول على DNA مركز بشكل أكثر أو إذا كان الـ DNA قد تم استخلاصه من كمية قليلة من الخلايا الجرثومية يتم عندها تقليل حجم وقاء الاستخلاص Elution Buffer إلى 50-100 مكل.

## ملاحظات هامة:

- لتخفيض درجة انحلال الـ DNA يجب تجنب حدوث التجمد والذوبان للعينات عدة مرات و كذلك إجراء الاستخلاص بمواد جديدة طازجة أو أن يكون قد تم تجميدها مباشرة وتخزينها في درجة حرارة (-20C°) أو (-70 C°).
- يضاف الإيتانول ذو التركيز (100-96%) لمحاليل الغسل Wash Buffer I و Wash Buffer II و المركزين وذلك عند الاستخدام الأول فقط لهما، وبعد إضافة الإيتانول توضع علامة على العبوة الحاوية على محاليل الغسل للإشارة بأنه قد تم إضافة الإيتانول إليهما.
- قبل استخدام محلول الـ Lysis Solution أو Digestion Solution يجب التأكد من عدم وجود ترسبات ملحية فيهما وفي حال وجودها فيتم إعادة حل هذه الترسبات بتدفئة المحلول (37 C°) ثم يتم تبريدهما مجدداً (25 C°) قبل الاستخدام.
- يجب ارتداء القفازات عند التعامل مع Lysis Solution و Wash Buffer I وذلك لاحتوائها على بعض المهيجات.

## ✓ المواد الإضافية والأجهزة المطلوبة

- i. ماصات ورؤوس للماصة.
- ii. رجاية Vortex.
- iii. إيتانول (100-96%).
- iv. مثقلة.
- v. أنابيب ثقيل بحجم 1.5 ml.
- vi. رجاية حرارية، حمام مائي رجاج، أو صفائح هزازة محملة لحرارة تصل إلى 56 C°.
- vii. قفازات للاستخدام مرة واحدة.

تجدر الإشارة إلى أن الحجم الصغيرة من وقاء الاستخلاص Elution Buffer ستؤدي إلى الحصول على كمية قليلة من الـ DNA المستخلص. كما يجب التخلص من عمود الاستخلاص، ويجب استخدام الـ DNA المستخلص مباشرةً أو يتم حفظه عند (-20 C°).  
التخزين

يحافظ محلول الـ Proteinase K و RNase A على ثباتهما في درجة حرارة الغرفة طالما أنه لم يتم فتحهما، ولكن بعد فتح المحلولين يجب أن يتم التخزين على درجة حرارة (-20 C°)، في حين أنه يجب تخزين المكونات الأخرى للكيت على درجة حرارة الغرفة (15-25 C°).

الملحق (4) عزلات الإشريكية القولونية

رقم العزلة	MIC	النمط الشكلي للمقاومة	<i>qnr</i>		<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Genomic <i>qnr</i>	
<b>Atcc 25922</b>	1/32	S						
1	64	R		<i>qnrS</i>	<i>aac(6')-Ib</i>			
2	16	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		<i>qnrS</i>
3	64	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>qnrB</i>	
4	1/16	S			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>
5	64	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
6	1/16	S			<i>aac(6')-Ib</i>		<i>qnrB</i>	
7	128	R						
8	1/2	S			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>
9	128	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>qnrB</i>	
10	2	I			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
11	2	I			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
12	64	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>qnrB</i>	
13	2	I			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
14	4	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
15	64	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
16	1/4	S						
17	1/2	S			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
18	64	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
19	1/4	S			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
20	128	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
21	16	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
22	128	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
23	128	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
24	1/16	S			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
25	32	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		<i>qnrS</i>
26	2	I			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
27	64	R		<i>qnrS</i>	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
28	1/16	S			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
29	4	R		<i>qnrS</i>	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
30	32	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
31	32	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
32	1/4	S	<i>qnrB</i>		<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
33	32	R	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
34	128	R	<i>qnrB</i>					
35	64	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
36	16	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
37	8	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		



38	64	R	<i>qnrB</i>						
39	256	R	<i>qnrB</i>		<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>			
40	4	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>qnrB</i>		
41	64	R	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>			
42	1/16	S		<i>qnrS</i>	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>			
43	32	R	<i>qnrB</i>		<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>			
44	1/16	S							
45	64	R							<i>qnrS</i>
46	2	I							
47	64	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>			
48	128	R	<i>qnrB</i>		<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>			
49	32	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>			
50	64	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>			<i>qnrS</i>
51	4	R	<i>qnrB</i>		<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>			
52	128	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>			<i>qnrS</i>
53	1/16	S			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>qnrB</i>		
54	1/4	S			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>			
55	1/16	S							
56	1/16	S			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>			
57	4	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>			
58	1/16	S	<i>qnrB</i>		<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>			
59	128	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>			<i>qnrS</i>
60	128	R		<i>qnrS</i>	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>			
61	4	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>qnrB</i>		
62	128	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>			
63	32	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>			
64	4	R							<i>qnrS</i>
65	1/16	S			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>			
66	32	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	
67	8	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>			
68	1/16	S			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>			
69	2	I			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>			
70	64	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>			
71	64	R						<i>qnrB</i>	
72	2	I	<i>qnrB</i>		<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>			
73	64	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>			
74	128	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>			<i>qnrS</i>
75	128	R							
76	64	R	<i>qnrB</i>		<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>			
77	4	R							
78	1/4	S							
79	64	R	<i>qnrB</i>		<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>			
80	2	I		<i>qnrS</i>					
81	128	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	

82	128	R		<i>qnrS</i>	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
83	1/16	S			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
84	1/16	S			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>qnrB</i>	
85	1/16	S						
86	64	R	<i>qnrB</i>		<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
87	4	R						
88	128	R		<i>qnrS</i>	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
89	4	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
90	128	R	<i>qnrB</i>		<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
91	64	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>qnrB</i>	
92	32	R	<i>qnrB</i>		<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
93	1/4	S	<i>qnrB</i>		<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
94	1/8	S	<i>qnrB</i>					
95	64	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>qnrB</i>	
96	1/2	S			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
97	2	I					<i>qnrB</i>	
98	128	R		<i>qnrS</i>	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
99	1/16	S						

ملحق (5) عزلات الكليبسيلا الرئوية

رقم العزلة	MIC	النمط الشكلي المقاومة	<i>qnr</i>		<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Genomic <i>qnr</i>	
<b>Atcc700603</b>	1/4	S						
1	1/16	S	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	<i>aac(6')-Ib</i>			
2	16	S	<i>qnrB</i>		<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
3	128	R		<i>qnrS</i>	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
4	256	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	-	<i>qnrS</i>
5	128	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>qnrB</i>	-
6	64	R		<i>qnrS</i>				
7	64	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
8	2	I	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	<i>aac(6')-Ib</i>			
9	32	R	<i>qnrB</i>		<i>aac(6')-Ib</i>			
10	1/16	S			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	-	-
11	4	R	<i>qnrB</i>		<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
12	128	R			<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
13	1/8	S	<i>qnrB</i>					
14	2	I		<i>qnrS</i>	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
15	2	I					<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>

16	32	R	<i>qnrB</i>		<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
17	64	R	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
18	4	R			<i>aac(6')-Ib</i>		-	-
19	64	R	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
20	128	R	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
21	32	R					-	<i>qnrS</i>
22	16	R					<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>
23	1	S	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		
24	128	R	<i>qnrB</i>		<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>		

\*ملاحظة : يشير اللون الرمادي إلى العزلات التي خضعت لاستخلاص جينومي

#### الملحق (6) تقارير تصنيع البوادئ

Gene	Sequence 5'-3'	OD الكثافة الضوئية	الحجم لـ 100 pmol/μl	Tm حرارة الانصهار C°	% GC المحتويات من GC
<i>qnrA-fw</i>	ATTTCTCACGCCAGGATTTG (20)	10.1	480	55.3	45%
<i>qnrA-rev</i>	GATCGGCAAAGGTTAGGTCA (20)	9.9	424	57.3	50%

<i>qnrB</i> -fw	GTACGTGAAAGCCAGAAAGG (20)	5.7	232	57.3	50%
<i>qnrB</i> - <i>rev</i>	ACGATGCCTGGTAGTTGTCC (20)	9.2	440	59.4	55%
<i>qnrS</i> -fw	GCAAGTTCATTGAACAGGGT (20)	8.3	359	55.3	45%
<i>qnrS</i> - <i>rev</i>	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG (21)	5.0	224	61.8	57.1%
<i>Aac(6')</i> - <i>lb</i> -fw	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCT A (23)	9.9	401	60.6	47.8%
<i>Aac(6')</i> - <i>lb</i> -rev	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT (20)	8.6	424	59.4	55%
<i>qepA</i> -fw	AACTGCTTGAGCCCGTAGAT (20)	8.3	379	57.3	50%
<i>qepA</i> - <i>rev</i>	GTCTACGCCATGGACCTCAC (20)	8.4	409	61.4	60%

### الملحق (7) النتائج الإحصائية

#### Correlations

MIC	<i>qnr</i>	<i>qnrS</i>	<i>qnrB</i>	<i>aac(6')-lb-cr</i>	
.208(*)	.010	-.006	.014	1.000	Correlation Coefficient <i>aac(6')</i> Spearman's rho
.021	.915	.945	.878	.	Sig. (2-tailed) <i>-lb-cr</i>
123	123	123	123	123	N
.063	.789(**)	.160	1.000	.014	Correlation Coefficient <i>qnrB</i>
.492	.000	.077	.	.878	Sig. (2-tailed)
123	123	123	123	123	N
.132	.612(**)	1.000	.160	-.006	Correlation Coefficient <i>qnrS</i>
.146	.000	.	.077	.945	Sig. (2-tailed)
123	123	123	123	123	N

.152	1.000	.612(**)	.789(**)	.010	Correlation Coefficient	<i>qnr</i>
.094	.	.000	.000	.915	Sig. (2-tailed)	
123	123	123	123	123	N	
1.000	.152	.132	.063	.208(*)	Correlation Coefficient	MIC
.	.094	.146	.492	.021	Sig. (2-tailed)	
123	123	123	123	123	N	

\* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

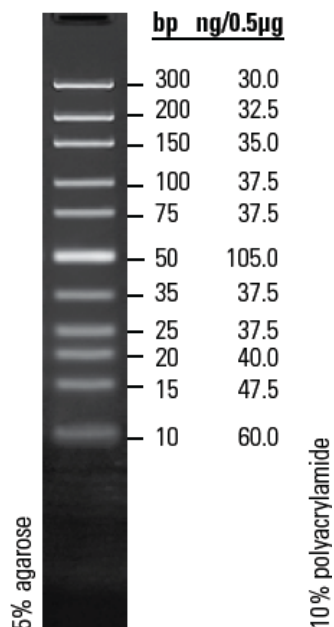
\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

### Correlations

<i>qnr</i>	<i>qnrS</i>	<i>qnrB</i>	MIC	Correlation Coefficient	MIC	Spearman's rho
.297	.268	-.074	1.000			
.053	.082	.636	.	Sig. (2-tailed)		
43	43	43	43	N		
.618(**)	-.104	1.000	-.074	Correlation Coefficient	<i>qnrB</i>	
.000	.508	.	.636	Sig. (2-tailed)		
43	43	43	43	N		
.535(**)	1.000	-.104	.268	Correlation Coefficient	<i>qnrS</i>	
.000	.	.508	.082	Sig. (2-tailed)		
43	43	43	43	N		
1.000	.535(**)	.618(**)	.297	Correlation Coefficient	<i>qnr</i>	
.	.000	.000	.053	Sig. (2-tailed)		
43	43	43	43	N		

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

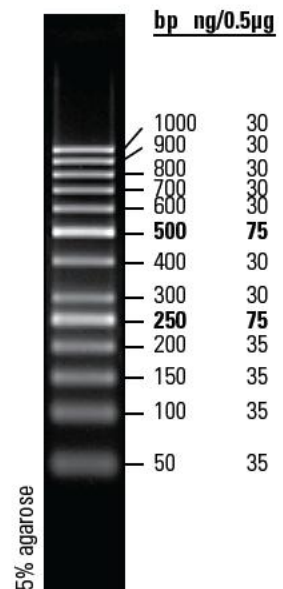
GeneRuler™ Ultra Low  
DNA Ladder #SM1211/2/

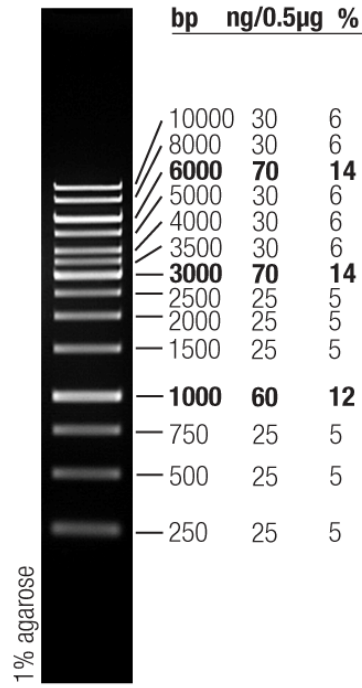


الملحق (8) صور فوتوغرافية لأهم الأجهزة

والأدوات المستخدمة

GeneRuler 50 bp  
DNA Ladder,  
#SM0371/2/3\*





0.5 µg/lane, 8 cm length gel,  
1X TAE, 7 V/cm, 45 min

**GeneRuler 1 kb DNA Ladder**

سلام الدنا المستخدمة في البحث



جهاز قارئ اليزا آلي



جهاز لإظهار حزم الرحلان الكهربائي مزود بكاميرا.



حجرة الزرع | Laminar Flow Clean Bench I



جهاز الصاد الموصل (الأوتوكلاف)



مبرد أنابيب بقياس 1.5 ml.





مدور حراري عادي thermocycler



مدور حراري متدرج gradient



مثقلة ميكرونية



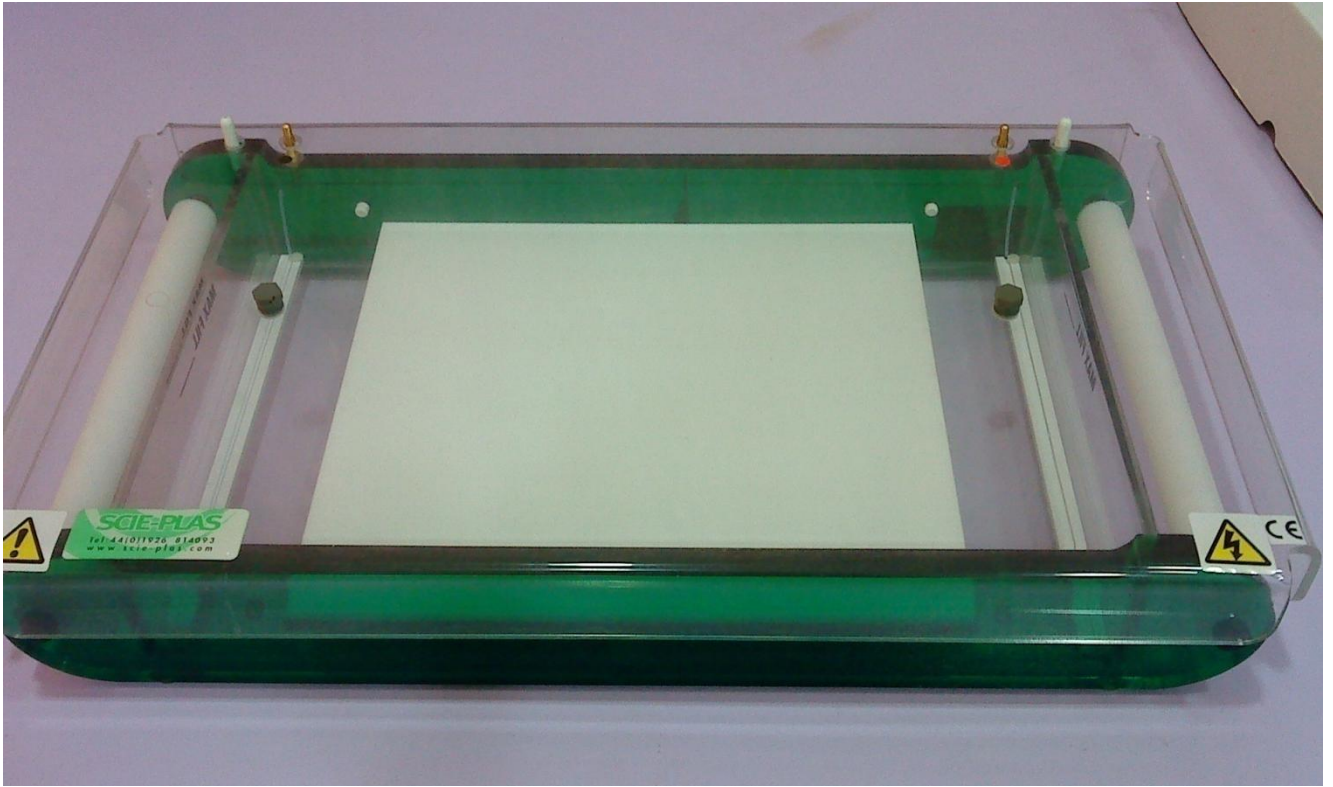
حامل تُلجى لآنايبب 0.2 مل



ماصات ميكرونية



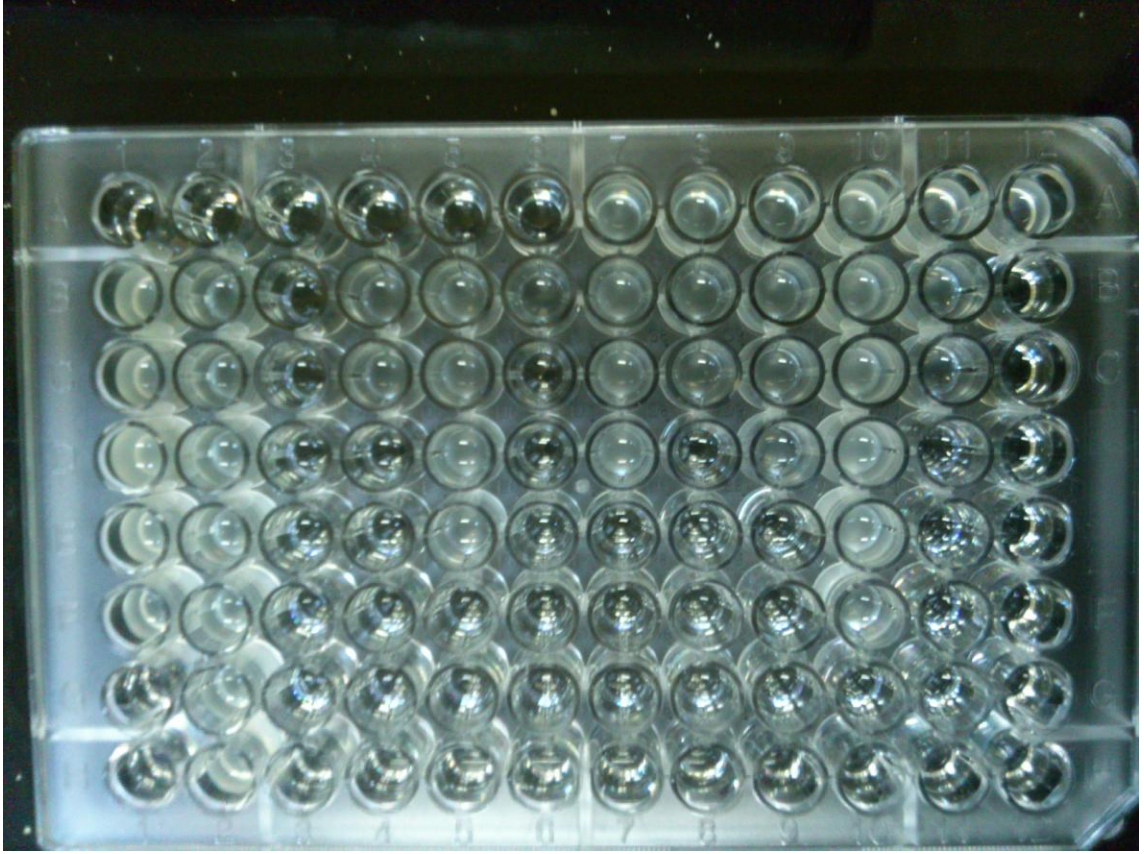
ماصة ميكرونية ثمانية الرؤوس 8-channel pipette



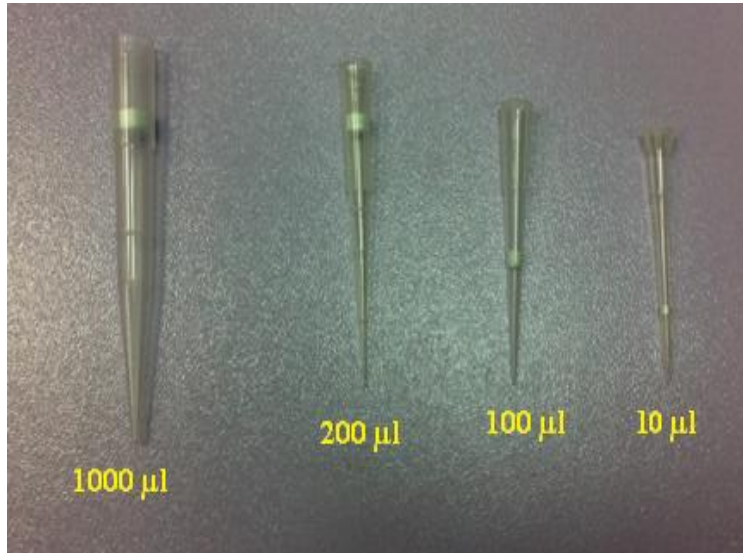
حوض الرحلان



وحدة التغذية الخاصة بالرحلان

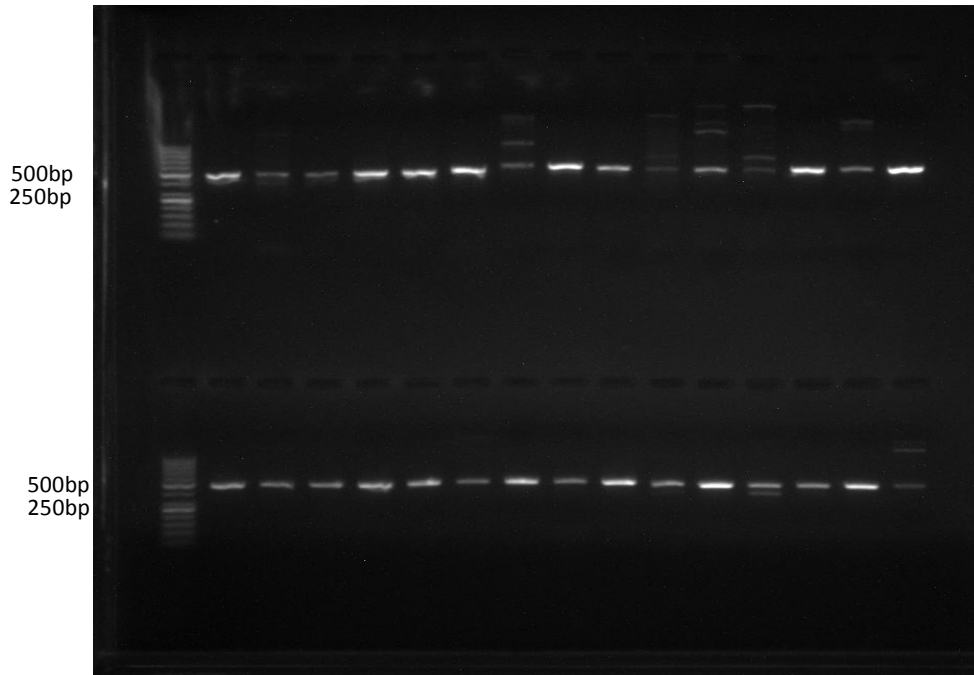


microplate صفيحة المعايرة الدقيقة

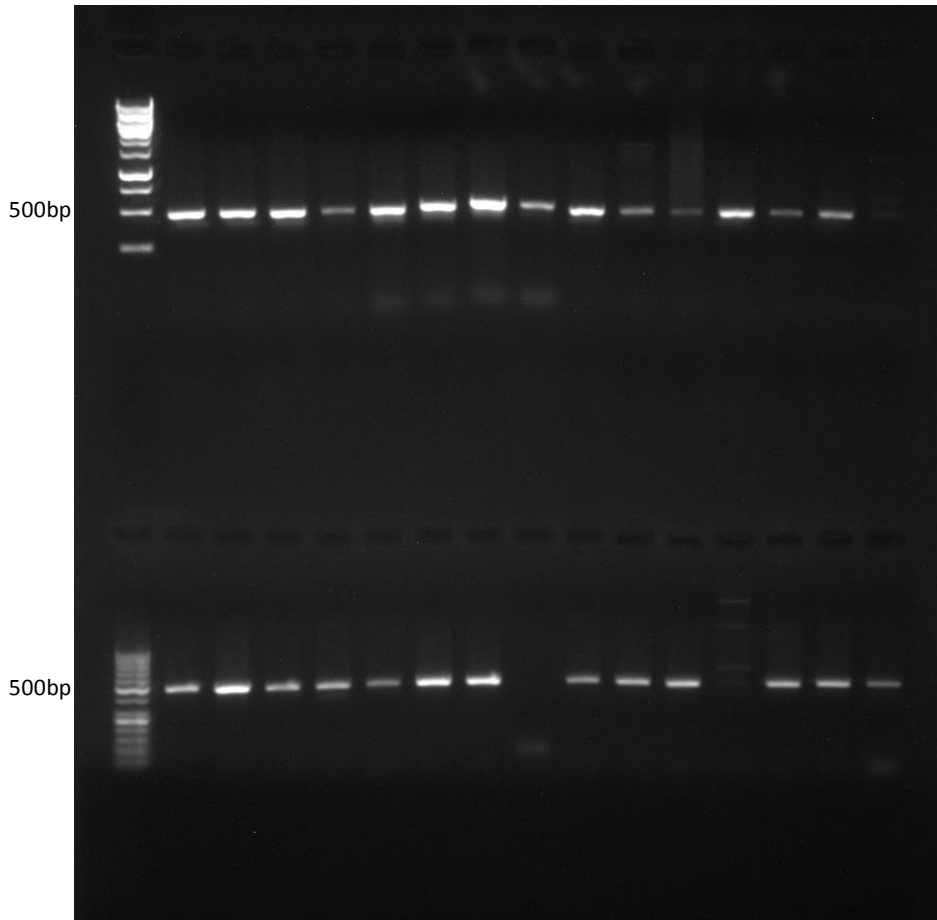


رؤوس ماصات ميكرونية بأحجام مختلفة.

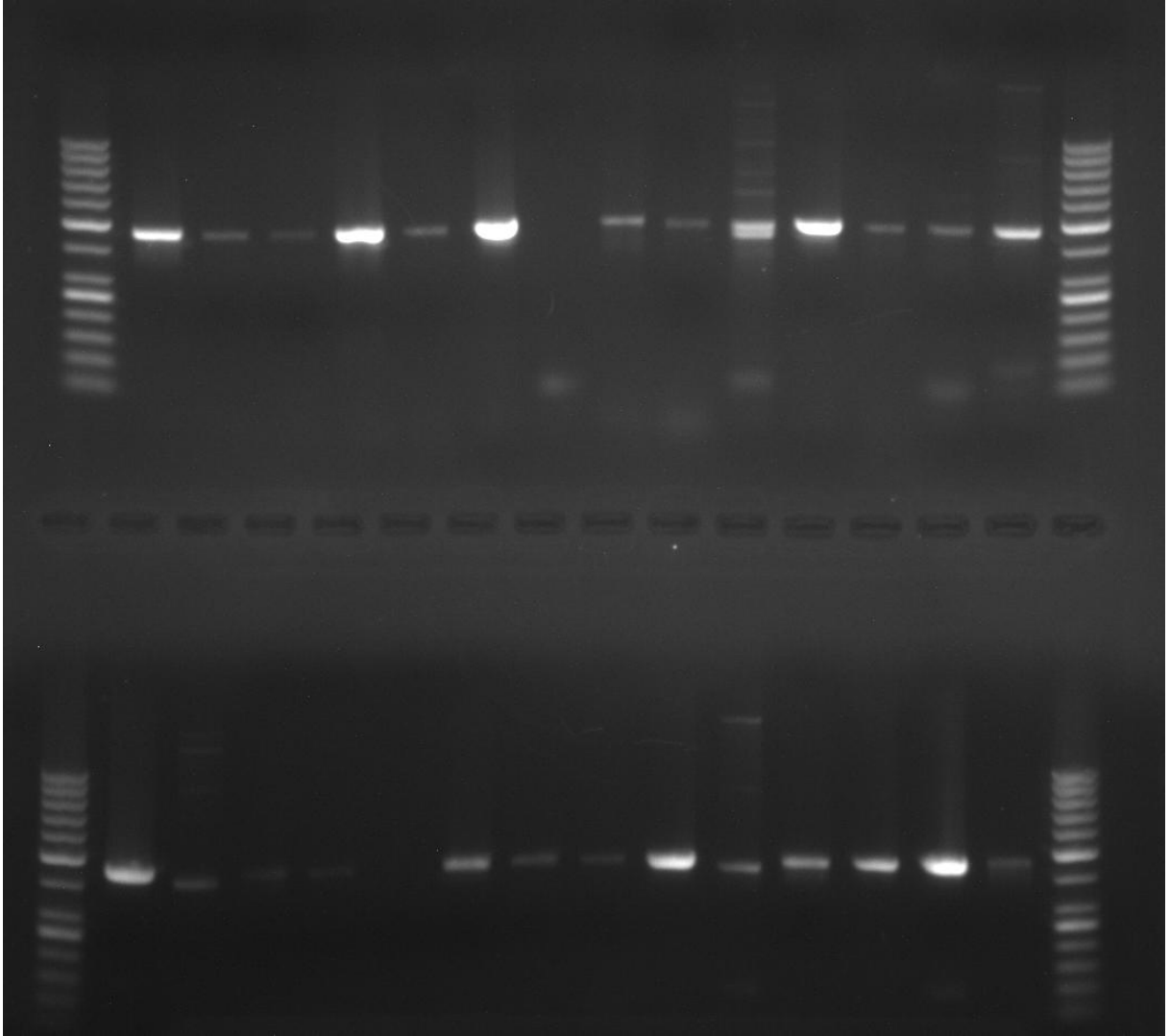
ملحق (9) صور لبعض هلامات الترحيل



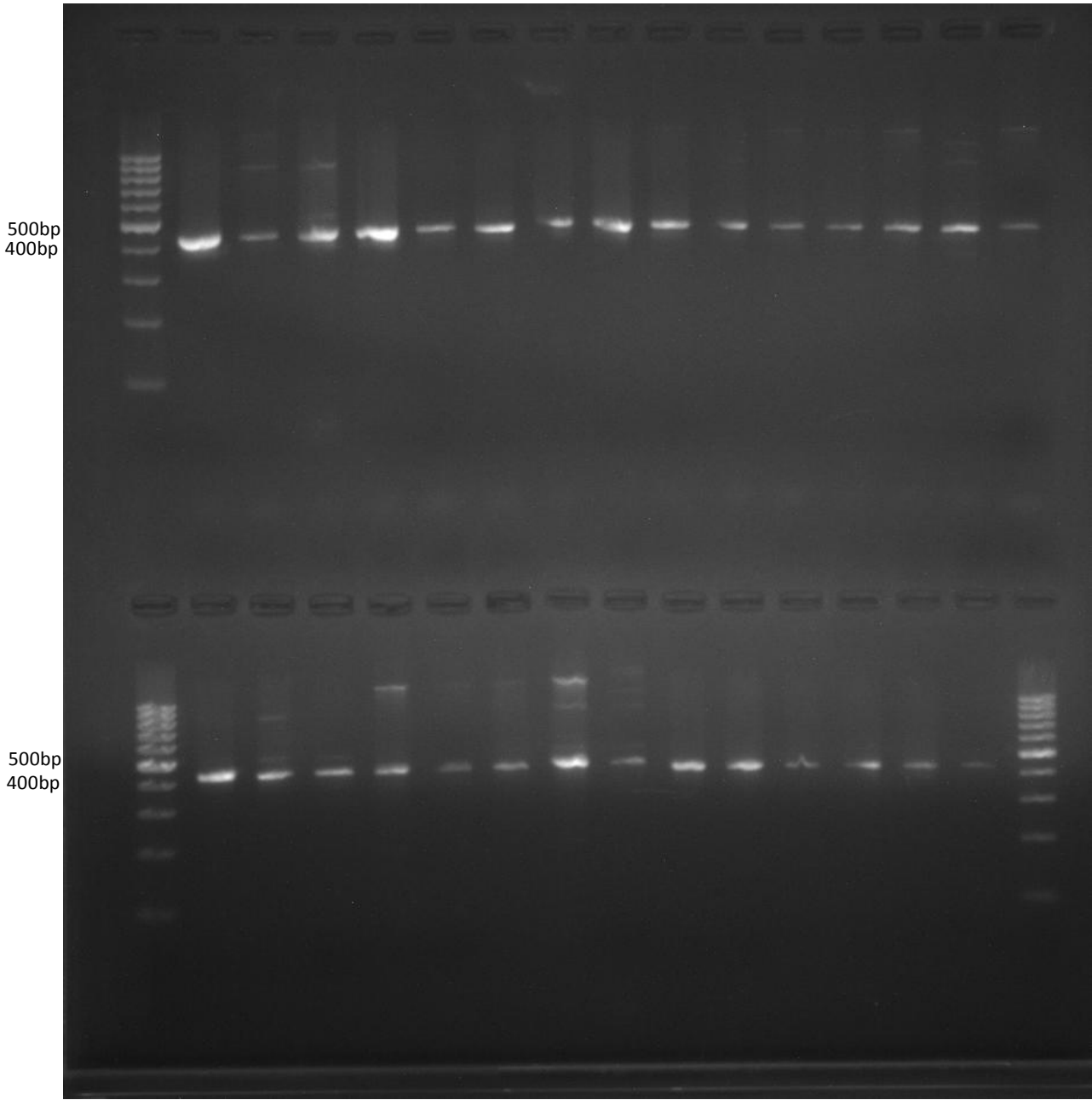
مورثة *aac(6')-Ib* (482bp) السلم GeneRuler50bp



مورثة *aac(6')-Ib* (482bp) السلم العلوي GeneRuler1Kb والسلم السفلي GeneRuler50bp



مورثة *qnrB* (469bp)، سلم GeneRuler 50bp



مورثة *qnrS* (428bp)، سلم GeneRuler 50bp





رحلان دنا مستخلص من العينات المدروسة

## Abstract

Clinical isolates of fluoroquinolone-resistant Enterobacteriaceae are emerging worldwide. The traditional resistance mechanism is the accumulation of mutations in the chromosome coding for the target molecules of fluoroquinolone . Recently, several plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes conferring low levels of quinolone resistance have been discovered. In this condition, bacterial cells have increased mutation frequency, making it easier the selection of higher-level fluoroquinolone resistance.

Our aims were to survey for plasmid-mediated quinolone resistance determinants in a collection of Enterobacteriaceae clinical isolates originating from Aleppo University Hospitals, and to characterize both the resistant isolates and the PMQR determinants ..

Altogether, 123 ESBL-producing Enterobacteriaceae clinical isolates were collected: 99 *Escherichia coli*, 24 *Klebsiella pneumoniae*. MIC values were determined by microdilution for ciprofloxacin. five PMQR genes [*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr* , and *qepA*] were screened by simplex PCR, of 123 isolates 103 were positives [42 *qnr* and 93 *aac(6')-Ib-cr*]. *aac(6')-Ib-cr* was the most common PMQR gene. None of the isolates carried *qnrA* or *qepA*.A high correlation of the *aac(6)-Ib-cr* variant with phenotypic ciprofloxacin resistance was found.

Keywords: PMQR; *qnr*; *aac(6')-Ib-cr*; *qepA*; ESBL.

## summary

### 1. Introduction

Quinolones and fluoroquinolones are broad-spectrum antimicrobial agents extensively used in both human and veterinary medicine, and therefore found as residues in the environment . This widespread use has been associated with increased level of quinolone resistance, particularly in the last 10 years . Bacterial resistance to quinolone is commonly resulted from chromosomal mutation, However, several recent studies revealed that such resistance could also be mediated by plasmid-carried genes (PMQR) : (i) Qnr proteins, which protect the quinolone targets; (ii) Aac(6')-Ib-cr enzyme, which acetylates not only aminoglycosides but also ciprofloxacin and norfloxacin; and (iii) QepA, a plasmid-encoded efflux pump.

The first plasmid-mediated quinolone resistance gene was named “*qnr*” in 1998. This gene encodes a 218 amino-acid protein Qnr (later named QnrA), a member of the pentapeptide-repeat family. More recently, four other proteins (QnrB and QnrS, QnrC and QnrD) have been identified in several enterobacterial species . These proteins interact with quinolones, the topoisomerases, and DNA, thus limiting the binding of the quinolones to their targets . By itself the *qnr* gene confers resistance to quinolones at a low level. But, they facilitate the acquisition of high-level resistance among initially susceptible strains .

In 2005, a second plasmid-mediated mechanism, which independently contributes to quinolone resistance by modification of the antibiotic molecule, was described , this protein, Aac (6')-Ib-cr, is a variant of the 6'acetyl transferase, which is known to modify the chemical structure of aminoglycosides, and presents an enlarged enzymatic spectrum toward ciprofloxacin and norfloxacin .

The last PMQR mechanism is mediated by QepA, which encodes an efflux pump belonging to the major facilitator subfamily, involved in pumping fluoroquinolones out of bacterial cells .

Recently, PMQR determinants have been identified worldwide with varying prevalence rates, in addition, their presence is associated with resistance to other antimicrobial agents, particularly to  $\beta$ -lactams .

In Aleppo, there is no previous study concerning the incidence of ciprofloxacin resistance and its association with PMQR genes, therefore, the aim of the current study is to determine the prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes in a collection of ESBL producing isolates of *E. coli* & *K. pneumonia* in Aleppo, Syria.

### 2.Methods

**2.1. Bacterial isolates.** A total of 123 non-duplicate ESBL-producing isolates (99 *E. coli* and 24 *K. pneumoniae*) were obtained from three university hospitals offering tertiary medical care in Aleppo city between October 2010 and June 2011. These isolates were stored in micro vials (Microbank™) at - 80°C.

Antimicrobial susceptibility test: A broth microdilution method was carried out to determine the minimum inhibitory concentration (MIC), in accordance with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI; formerly NCCLS) guidelines .

Each bacterial suspension was adjusted to the turbidity of a 1 McFarland standard which contains approximately  $1.5 \times 10^8$  cfu/mL and diluted in broth to give a final organism density  $5 \times 10^5$  cfu/well, and inoculated onto micro plates containing the test drug at various concentrations, and each plate was incubated for 18 h at (35-37)°C. Reference strains (*E. coli* ATCC 25922 and *K. pneumoniae* ATCC 700603) were included in each run as controls. MIC breakpoints used for susceptibility and resistance to ciprofloxacin were ( $\leq 1, \geq 4$ ) µg/mL respectively.

Screening procedures: Plasmids were extracted using QIAprep Miniprep Kit, following the manufacturer's recommendations (Qiagen). Screening for *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib*, and *qepA* was performed by simplex polymerase chain reactions (PCRs) with specific primers and PCR conditions as previously described .

Negative controls (without DNA template) were included in each run. Amplification products were identified by their sizes after electrophoresis on 1.5% agarose gels at 130 V for 25 min and staining with ethidium bromide.

For *aac(6')-Ib*, all PCR products positive for *aac(6')-Ib* were further analyzed by digestion with *BtsCI* (**Thermo scientific**) to identify *aac(6')-Ib-cr*, which lacks the *BtsCI* restriction site present in the wild-type gene . The wild-type *aac(6')-Ib* PCR product yielded 210-bp and 272-bp fragments after restriction . The extraction method was performed using the QIA prep Miniprep Kit (**Qiagen**).

### **3.Results**

Phenotypic confirmatory method: The MIC of ciprofloxacin ranged from 1/16 to 256 µg/mL. we found that 65.81% of our isolates were resistant to ciprofloxacin. MICs of the antimicrobial agents for the isolates are shown in Table 1.

Table 1. MIC distribution of Ciprofloxacin of *E. coli* & *K. pneumoniae* isolates.

	MIC $\mu\text{g/mL}$	Number of isolates	%
Sensitive isolates	1/16	18	14.63
	1/8	2	1.62
	1/4	6	4.87
	1/2	3	2.43
	1	1	0.81
Intermediate isolates	2	12	9.75
	4	12	9.75
	8	2	1.62
	16	5	4.06
Resistant isolates	32	12	9.75
	64	25	20.32
	128	23	18.69
	256	2	1.62

MIC, minimum inhibitory concentration

Prevalence of PMQR genes : Overall, 123 isolates were included in this study. Only 34.14% (42/123) were confirmed to have at least one of the three *qnr* genes. The prevalence of each PMQR gene is shown in (Table 2)

Table 2. Prevalence of five PMQR determinants

Species	Total no. of isolates (%)	No. of isolates positive for (%)					
		<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>qepA</i>
<i>E. coli</i>	99 (80.5)	0	18(18.1)	11(11.1)	80(80.8)	78(78.78)	0
<i>K. pneumoniae</i>	24 (19.5)	0	12(50)	9(37.5)	18(75)	15(62.5)	0
Total	123	0	30(24.4)	20(16.3)	98(79.7)	93(75.6)	0

In total, *qnr* genes were detected most frequently in *K. pneumoniae* 62.5%(15/24), followed by *E. coli* 27.27%(27/99). Both *qnrB* & *qnrS* were significantly more prevalent among *K. pneumoniae* than among *E. coli*, *aac(6')-Ib-cr* was the most prevalent PMQR gene among our isolates 75.6% (93/123), and *aac(6')-Ib-cr* accounted for 94% (93/98) of the *aac(6')-Ib* genes detected, as well as, we noticed the absence of both *qnrA* & *qepA*.

The distribution of PMQR determinants among our isolates and their corresponding MICs are shown in table 3

Table 3. MIC values of our PMQR positive isolates

GENES	ISOLATES(N)	MIC $\mu\text{g/mL}$ (%)			
		1/16 – 1/2	1 – 4	8 – 32	64 – 256
<i>qnrB</i>	<i>E. coli</i> (18)	4(22.2)	2(11.1)	3(16.6)	9(50)
	<i>K. pneumoniae</i> (12)	2(16.6)	3(25)	3(25)	4(33.3)
<i>qnrS</i>	<i>E. coli</i> (11)	1(9)	2(18.1)	1(9)	7(63.6)
	<i>K. pneumoniae</i> (9)	1(11.1)	3(33.3)	0	5(55.5)
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>E. coli</i> (78)	18(23)	13(16.6)	14(17.9)	33(42.3)
	<i>K. pneumoniae</i> (15)	1(6.6)	3(20)	2(13.3)	9(60)
<i>qnrB</i> + <i>qnrS</i>	<i>E. coli</i> (2)	0	0	1(50)	1(50)
	<i>K. pneumoniae</i> (6)	1(16.6)	2(33.3)	0	3(50)

<i>qnrB</i> + <i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>E. coil</i> (15)	3(20)	2(13.3)	3(20)	7(46.6)
	<i>K. pneumoniae</i> (8)	0	2(25)	2(25)	4(50)
<i>qnrS</i> + <i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>E. coil</i> (9)	1(11.1)	1(11.1)	1(11.1)	6(66.6)
	<i>K. pneumoniae</i> (6)	0	2(33.3)	0	4(66.6)
<i>qnrB</i> + <i>qnrS</i> + <i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>E. coil</i> (2)	0	0	1(50)	1(50)
	<i>K. pneumoniae</i> (4)	0	1(25)	0	3(75)

### Detection of genomic *qnr*

43 isolates was randomly chosen for *qnr* detection on the genome by using the same PCR conditions mentioned above.

Table 4. distribution of *qnr* among the genome of 43 isolates

Phenotype (n)	(n)	Genotype n(%)		
		<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	<i>qnr</i>
Resistant (30)	<i>E. coil</i> (25)	10	10	18
	<i>K.pneumoniae</i> (5)	2	3	4
Intermediate(5)	<i>E. coil</i> (4)	1	0	1
	<i>K.pneumoniae</i> (1)	1	1	1
Sensitive(8)	<i>E. coil</i> (7)	5	2	5
	<i>K.pneumoniae</i> (1)	0	0	0
	<b>total</b>	<b>19</b>	<b>16</b>	<b>29</b>

Overall, 18.6% (8/43) were sensitive, 11.6%(5/43) intermediate and 69.7% were resistant .

The prevalence of *qnrB* was (44.1) %19/43, *qnrS* 37.2% (16/43), and there was a significant relationship between *qnr* distribution on the genome and the prevalence of phenotypic ciprofloxacin resistance.

### 4.Discussion

It has been more than 30 years since the fluoroquinolones were introduced into Syria. A Syrian study suggested that the resistance rate against ciprofloxacin reached 39.1%, with upward trends in the use of fluoroquinolones in community

and hospital settings .In the present study, (65.81%) of our ESBL-producing isolates recovered at Aleppo University Hospitals were detected as resistant to ciprofloxacin, therefor we investigated the prevalence of PMQR determinants, and analyzed their association with phenotypic ciprofloxacin resistance.

Previous studies reported that *qnr* was rare , but in this work we found that the prevalence of *qnr* genes in our study was higher (34.14%) than other studies. Although the prevalence of each PMQR gene responsible for resistance varied by species, *qnr* genes were more prevalent among *K. pneumoniae*. (62.50%, 15/24) than among *E. coli* (27.27%, 27/99), as previously described in other studies conducted in France, the United States, Spain, and China. The most frequent *qnr* gene was *qnrB* (24.4%), as in other studies, and we noticed the absence of *qnrA* gene as noted in studies .

Notably, there was no statistically significant association between *qnr* and ciprofloxacin resistance, also, *qnr* genes were common among ciprofloxacin-sensitive/intermediate isolates(12/42) 28.5%, as well as, in resistant isolates (30/81)37%. Our findings agree with other reports demonstrating that *qnr* alone did not ensure resistance to fluoroquinolones; however, its presence may facilitate the selection of additional chromosomally mechanisms such as changes of DNA gyrase (*gyrA*) and/or topoisomerase IV (*parC*) genes, and the presence of *qnr* does not necessarily lead to MICs above CLSI breakpoints for resistance to ciprofloxacin . Furthermore, using ciprofloxacin breakpoints as marker for detection may underestimate the prevalence of *qnr* genes, which raises the concern of hidden spread of those genes, and infections caused by *qnr*-positive isolates might subsequently be treated by quinolones, therefore, enhancing the selection of resistant mutants, and increasing the risk of therapeutic failure.

On the other hand, there was an association between ciprofloxacin resistance and genomic *qnr* distribution within 43 isolates; however, these genes might be integrated into our genomes.

Results of this study revealed the absence of *qepA* gene among the studied strains. The *qepA* efflux pump, first described in 2007 in two *E. coli* clinical isolates from Japan and Belgium has already been detected in France with a new variant *qepA2* . However, this new PMQR mechanism is still very rare, except in China where two recent studies underlined the predominance of *qepA* gene in enterobacterial strains isolated from foodproducing animals

The most surprising finding of our study was the wide penetration of the *aac(6')-Ib-cr* allele with a higher prevalence (75.6% ) than *qnr* genes(43.14%).

Noteworthy, *aac(6')-Ib-cr* accounted for 94% (93/98) of the *aac(6')-Ib* genes detected.

This high proportion of *aac(6')-Ib-cr/aac(6')-Ib* was also reported in other studies . This high percentage probably reflects a longtime emergence and still ongoing dissemination of underdetected *aac(6')-Ib-cr*, and its presence as part of an integron cassette suggests that it could be widely mobile among plasmids.

Whereas the *qnr* genes predominated in *K. pneumoniae*, *aac(6')-Ib-cr* was the most prevalent gene in *E. coli* (78/99, 63.4%) than in *K. pneumonia*. (15/24, 12.20%). These differences are in accord with previous observations. The reason for these differences is not yet understood, since it is known that some plasmids can carry both *aac(6')-Ib-cr* and *qnrA* genes .

In order to investigate the contribution of *aac(6')-Ib-cr* gene to ciprofloxacin resistance, we analyzed the relationship between *aac(6')-Ib-cr* and resistance to ciprofloxacin. However, our resistant isolates were significantly more frequently *aac(6')-Ib-cr* –positive(66/81) 81.48% than were sensitive/intermediate isolates (27/42) 64.28%, thus, *aac(6')-Ib-cr* determinant was significantly associated with phenotypic ciprofloxacin resistance.

There was no relationship between the presence of *qnrA*, *-B*, or *-S* genes and *aac(6')-Ib-cr*, *qnr* genes were present in (33.33%) 31/93 *aac(6')-Ib-cr*-positive strains compared to (28.57%) 10 / 35 *aac(6')-Ib-cr*-negative strains, indicating that the *qnr* genes and *aac(6')-Ib-cr* can circulate independently. This result is consistent with previous result , and in contrast with another result reported from China where the prevalence of the *aac(6')-Ib-cr* variant among *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates was 55.2% among *qnr*-positive isolates but only 6% among *qnr* negative isolates.

In **conclusion**, our study showed that the prevalence of plasmid-mediated *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* resistance genes was high among syrian clinical ESBL-producing isolates of *E. coli* and *K. pneumonia*, and more associations should be studied in the future. The distribution of *aac(6')-Ib-cr* variant, however differed among species, it was detected most often in *E. coli* isolates, and least often in *K. pneumonia* isolates, a relative prevalence that is the reverse of that for *qnr* genes. Furthermore, *qnr* genes were more prevalent in *K. pneumoinae* than *E. coli*, *qnrB* was more frequent than *qnrA* or *qnrS*, and the prevalence of ciprofloxacin resistance in our isolates was associated with the prevalence of *aac(6')-Ib-cr* variant.



Finally, it seems likely that the increasing use of fluoroquinolones within the last 10 years created the opportunity for the emergence of ciprofloxacin-resistant clinical isolates with PMQR determinants. Further regional epidemiological data on antimicrobial resistance throughout Syria will be required to promote appropriate antimicrobial therapy, and effective infection control, and using antibiotics that are not substrates for *aac(6')-Ib-cr* might reduce selection pressures for this variant but not for the *qnr* genes.

**Syrian Arab Republic**

**Aleppo University**

**Faculty of Pharmacy**



**Detecting of Quinolone Resistance Genes in *E.coli* and *K. pneumoniae* Isolated from Aleppo University Hospitals**

**A thesis submitted in partial fulfillment for the requirements of the degree  
of Master of Science in Laboratory Diagnosis**

**Submitted by**

**Omar Alheib**

**Supervised by**

**Dr. Rawa Al-Kayali**

Assistant Professor in  
Biochemistry and Microbiology.  
Faculty of Pharmacy, Aleppo University

**Dr. M. Yaser Abajy**

Assistant Professor in  
Biochemistry and Microbiology  
Faculty of pharmacy, Aleppo University

**2014**

**Syrian Arab Republic**  
**Aleppo University**  
**Faculty of Pharmacy**



**Detecting of Quinolone Resistance Genes in *E. coli* and *K. pneumoniae* Isolated from Aleppo University Hospitals**

**A thesis submitted in partial fulfillment for the requirements of the degree  
of Master of Science in Laboratory Diagnosis**

**Submitted by**

**Omar Alheib**

**2014**